



9/743828

# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

REC'D 23 AUG 1999

WIPO PCT



INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. ....RM98-A-000478

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati*

*risultano dall'accluso processo verbale di deposito. Inoltre;  
Verbale UPICA di Roma scioglimento riserve n° RM R 0990  
del 16.9.1998 contenente n° 14 tavole disegni definitivi.  
(Pag.15).*

R ma, li 26 LUG 1999

IL REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE  
D.ssa Paola DI CINTIO

*Paola Di Cintio*

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione PLANTEO S.r.l. N. ISR  
Residenza CASALMAGGIORE (CREMONA) ITALIA I codice 01080070194  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome de Benedetti Fabrizio ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.  
via Piazza di Pietra n. 0039 città ROMA cap. 00186 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap. \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

"POLINUCLEOTIDE SINTETICO CODIFICANTE PER LA LATTOFERRINA UMANA, VETTORI, CELLULE E PIANTE TRANSGENICHE CHE LO CONTENGONO".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) FOGHER Corrado 3) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_ 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ nessuna

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLECATI

M. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 112 riassunto con disegno principale (obbligatorio 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 2) 12 PROV n. tav. 13 disegno (obbligatorio se citato in descrizione 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 3) 10 RS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale \_\_\_\_\_  
Doc. 4) 10 RS designazione inventore \_\_\_\_\_  
Doc. 5) 10 RS documenti di priorità con traduzione in italiano \_\_\_\_\_  
Doc. 6) 10 RS autorizzazione o atto di cessione \_\_\_\_\_  
Doc. 7) 10 nominativo completo del richiedente \_\_\_\_\_

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire un milione quattrocentoquindici mila obbligatorio

COMPILATO IL 17 07 1998 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) Gilberto Tonon

CONTINUA SIND NO (acc. Albo n. 83 BM)

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SIND SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 98 A 000478

ROMA codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

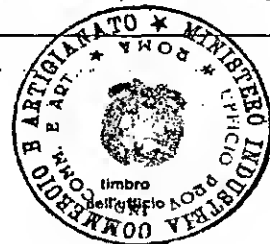
L'anno millenovecento novantotto il giorno Diciassette del mese di Luglio

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Massimo



L'UFFICIALE ROGANTE

Silvio Altieri



La generazione di piante ricombinanti contenenti un gene eterologo di interesse, e la loro utilizzazione in procedimenti di produzione su scala industriale, consente infatti di superare una serie di inconvenienti che caratterizzano i sistemi di produzione attualmente in uso ed in particolare quelli basati su colture cellulari.

La tecnologia del DNA ricombinante ha consentito infatti la generazione di cellule transgeniche che vengono utilizzate per la produzione di proteine eterologhe di interesse. In particolare le colture di cellule animali e specificamente di mammifero, consentono di produrre proteine di interesse anche estremamente complesse nella forma nativa, ma il relativo procedimento è estremamente dispendioso, dato che sono necessari centinaia di litri di cellule per la produzione di una quantità di proteine sufficiente per un uso commerciale (ad esempio farmacologico o alimentare) (Stowell et al., 1991).

Un'alternativa in questo senso è data allora dalla produzione realizzata in colture di cellule procariotiche, un procedimento più economico che però incontra un limite importante nella incapacità di questi sistemi di operare le modifiche post-

trascrizionali e traduzionali necessarie per la espressione di proteine eterologhe complesse, che solo i sistemi eucariotici sono in grado di effettuare (Glick e Pasternak, 1994).

Una soluzione è stata quindi ricercata nella trasformazione di sistemi eucariotici complessi, in grado di garantire la produzione di proteine attive, con procedimenti al contempo economici (Watson et al. 1992).

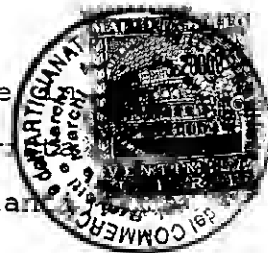
Le piante, in particolare, possiedono le potenzialità necessarie, e la loro capacità di fungere da bioreattori per la produzione di proteine complesse (le piante sono molto efficienti in questo tipo di processi e garantiscono una qualità di espressione elevata), in modo economico (la coltivazione delle piante è relativamente poco dispendiosa) e con un elevato rendimento (da ciascun singolo raccolto possono esser ottenute elevate quantità di proteine) è stata dimostrata (Fraley e Schell, 1991).

Inoltre moltissime piante, rispondono positivamente all'importante requisito della non-allergenicità richiesto per i sistemi di produzione di proteine ricombinanti di interesse farmacologico o alimentare. Gli organismi utilizzati in queste

produzioni devono infatti appartenere alla categoria degli organismi GRAS (Generally Recognised As Safe), cioè organismi che in quanto utilizzati da lungo tempo dall'uomo, sono considerati sicuri sia per l'uomo che per l'ecosistema. Piante come le leguminose, i cereali, il tabacco, le orticole in genere e gli alberi da frutto, soddisfano naturalmente questo requisito. Tra le leguminose particolare interesse riveste la soia, alimento base della dieta di molte popolazioni, soprattutto dei paesi del terzo mondo, ma di recente anche dei paesi europei. Composti derivati dalla soia costituiscono infatti ingredienti presenti in moltissimi alimenti, come ad esempio la lecitina e l'olio di semi, mentre dai semi di questa leguminosa si ricava una farina che viene utilizzata in diverse formulazioni alimentari, come ad esempio il latte di soia che ne contiene circa l'8%.

In questo senso le piante, pur essendo utilizzabili come materia prima dalla quale può essere estratto il prodotto secondo i procedimenti convenzionali, costituiscono contemporaneamente un'alternativa alla produzione convenzionale. Esse infatti possono essere utilizzate come cibi

funzionali, cibi cioè modificati geneticamente modo da essere arricchiti da un punto di vista nutrizionale e assumere, se del caso, importanti proprietà di farmaco naturale.



In questo modo viene eliminato il passaggio della estrazione della proteina dalla pianta, e la espressione della proteina eterologa non prelude ad una sua estrazione e purificazione, passaggi da cui deriva gran parte del costo di produzione di un farmaco, ma va semplicemente ad arricchire un alimento vegetale, che diviene così un nutraceutical cioè un nutrimento con valenza farmacologica.

Da ciò si comprendono gli sforzi compiuti dalla ricerca per la generazione di piante geneticamente modificate, ottimizzate per le applicazioni su menzionate.

La valutazione della capacità di espressione eterologa caratteristica di varie specie di piante è stata fino ad oggi però realizzata esclusivamente in laboratorio o comunque su superfici relativamente limitate in serra.

Ad esempio è stata analizzata la espressione in pianta dell'encefalina e dell'albumina sierica umana, così come anche oggetto di studi è stata

l'espressione in pianta di anticorpi monoclonali di topo (Watson et al., 1992). Più recentemente, sempre in riferimento a proteine rilevanti dal punto di vista farmacologico, altre due proteine umane di importanza terapeutica, l'interleuchina-6 attiva e la proteina C (un anticoagulante del siero), sono state espresse con successo in tabacco. In tutti questi casi la pianta modello su cui si verifica la funzionalità del gene preparato è il tabacco, mentre la pianta finale scelta per la produzione solitamente è una leguminosa, il cui seme è ricco di proteine di riserva.

Tali esperimenti hanno dimostrato che spesso i livelli di espressione della proteina eterologa nei bioreattori vegetali non raggiungono valori sufficienti per rispondere alle esigenze commerciali e che comunque questi possono essere migliorati applicando le nuove informazioni sulla regolazione genica delle piante. Si è dimostrato in particolare che, per essere economicamente significativo il livello di proteina ricombinante prodotta deve raggiungere valori superiori all'1% del contenuto proteico totale, livello naturalmente non raggiunto in seguito alla semplice introduzione

del gene eterologo, la cui espressione deve essere quindi massimizzata..

In relazione alla biologia della cellula vegetale, per operare la massimizzazione del livello di espressione in pianta occorre agire su vari piani: aumento della trascrizione genica, aumento della stabilità del trascritto e della resa del processo di traduzione. E' necessario inoltre fissare il gene introdotto e minimizzare il rischio del manifestarsi di fenomeni di silenziamento ("silencing") o disattivazione genica. Tutti questi fattori sono decisivi nel determinare il livello di espressione del gene eterologo in pianta, la quale, come si è detto, al di là di alcune eccezioni in genere si assesta su livelli piuttosto bassi (Owen e Pen, 1996).

Tra tutti questi, il fattore più importante, assieme al livello di trascrizione dipendente dalla presenza preferenziale di certi codoni, sembrerebbe essere la stabilità della proteina ricombinante nell'ospite eterologo, probabile causa della loro facile eliminazione. La relativa instabilità potrebbe essere conseguente, da una parte alla incapacità della proteina eterologa tradotta di assumere una conformazione strutturale stabile,

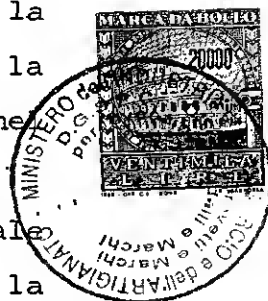
dall'altra anche al compartimento subcellulare in cui essa viene indirizzata successivamente alla traduzione, dove la presenza di proteasi e particolari valori di pH ne determinano la degradazione.

In questo senso, è quindi importante sia provvedere alla modifica delle sequenze eterologhe in modo da garantire l'ottimizzazione dei codoni che anche operare una attenta selezione delle sequenze di "targeting", capaci di indirizzare la proteina tradotta in comparti subcellulari preferenziali, come per es. i tessuti di riserva del seme, in grado di garantire la stabilità del prodotto. In relazione a quest'ultima considerazione, la migliore strategia di azione in questo senso, è quella che prevede il mantenimento delle sequenze segnale (denominate da qui in avanti anche "leader") endogene della pianta scelta per la produzione finale. L'adozione di tali sequenze evita infatti, la alterazione dell'equilibrio cellulare interno, conseguente all'inevitabile accumulo disordinato di proteine esogene che si verificherebbe in loro assenza. A questo riguardo inoltre è necessario tenere conto del fatto che i

compartimenti subcellulari assumono caratteristiche differenti nelle cellule dei vari tessuti.

Le proteine eterologhe accumulate assieme alle proteine di riserva dei semi, nelle piante transgeniche, sono ad esempio molto più stabili rispetto a quelle degli organi vegetativi (Owen e Pen, 1996). La ragione di tale differente stabilità risiede probabilmente nelle differenti attività proteasiche registrate nei vacuoli delle cellule del meristema fogliare, rispetto a quelle registrate nei vacuoli dei semi. E' comprensibile quindi che gli sforzi siano concentrati verso la generazione di piante transgeniche in cui la proteina eterologa sia espressa preferibilmente nel seme (Owen e Pen, 1996).

Il seme inoltre rappresenta l'organo vegetale in assoluto più utilizzato dall'uomo per la facilità di conservazione e, ovviamente, per l'apporto calorico e proteico. Il seme consiste nell'embrione della pianta avvolto da tessuti di riserva che forniscono energia ed azoto durante la germinazione. Normalmente è l'endosperma ad avere prevalentemente la funzione di tessuto di riserva, ma nei legumi, come per esempio la soia, i



cotiledoni si sviluppano notevolmente ed acquisiscono questa funzione.

La funzione di riserva, per la componente azotata, viene svolta da proteine particolari accumulate nei corpi proteici, all'interno di compartimenti nei sistemi di endomembrane cellulari. La quantità di proteine presenti nel seme varia da circa il 10-15% nei cereali a circa il 25-35% nelle leguminose, per cui i semi sono una fonte importante di proteine per la dieta umana (Shewry et al., 1995).

Al fine di sfruttare il sistema di espressione delle proteine di riserva del seme è necessario considerare in via preliminare che le proteine di riserva di tutti i vegetali sono accomunate da alcune caratteristiche funzionali e fisiologiche: la loro sintesi è regolata in base alle esigenze nutrizionali durante la maturazione del seme e sono conservate in corpi proteici. Le proteine di riserva delle leguminose sono in particolare divise in due classi: globuline e lectine. Le globuline sono le proteine di riserva più diffuse, essendo presenti non solo nelle leguminose, ma anche nelle monocotiledoni e in altre dicotiledoni. La classe delle globuline a sua volta è divisa in due

sottoclassi: le legumine (proteine esameriche 11S) e le viciline (proteine trimeriche 7S). Alla sottoclasse delle viciline appartengono anche le proteine  $\beta$ -congliscinina e globulina basica 7S, i cui elementi di regolazione sono stati utilizzati per realizzare la espressione tessuto specifica nel seme (Shewry et al., 1995), ma mentre il primo è stato studiato in dettaglio, per la globulina basica non si hanno informazioni dettagliate sul suo funzionamento.

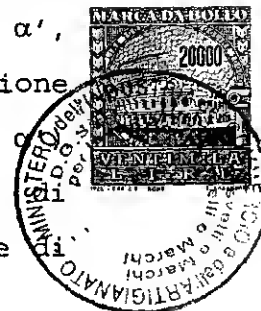
La  $\beta$ -congliscinina è una proteina di riserva del seme di soia (*Glycine max*), composta da tre subunità diverse,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ , che interagiscono non covalentemente formando un complesso trimetrico. Le subunità sono codificate da una famiglia multigenica di 15 geni raggruppati in sei regioni del DNA nucleare, la cui espressione è strettamente regolata in modo da essere modulata durante la vita della pianta (Harada et al. 1989). La regolazione è del tipo sia stadio specifica che tessuto specifica. La espressione di ciascuna subunità infatti, viene attivata a livelli elevati al momento dello sviluppo dell'embrione, dalla fase a cuore fino alla maturazione completa, mentre prima della fase di dormienza viene repressa.

Inoltre l'espressione avviene solo in zone specifiche della pianta, quali i cotiledoni, secondo un "pattern" di espressione che varia nel corso della loro maturazione; dapprima viene attivata nella zona cotiledonare esterna, poi si registra una distribuzione ad onda dall'esterno verso l'interno ed infine risulta diffusa uniformemente in tutto il tessuto cotiledonare. Il gene per la  $\beta$ -conglucininina si esprime comunque anche nell'asse embrionale, durante la fase a cuore (18 giorni dopo l'impollinazione), mentre non si esprime nell'endosperma, nei tegumenti e nei tessuti già differenziati (Perez-Grau e Goldberg, 1989). Lo stesso comportamento si verifica anche nel seme di piante transgeniche appartenenti ad altre famiglie, come per esempio il tabacco, confermando che lo stesso meccanismo di regolazione è funzionale anche nelle solanaceae (Naito et al. 1988; Perez-Grau e Goldberg, 1989).

La regolazione dell'espressione genica delle subunità  $\alpha/\alpha'$  e  $\beta$  avviene sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale (Harada et al., 1989). La subunità  $\alpha'$ , di 76 Kd, con un mRNA di 2,5 Kb, viene accumulata più precocemente ed in quantità maggiore della subunità  $\beta$ . Questo

comportamento è dovuto alla maggior forza del promotore della subunità  $\alpha'$  dovuto alla presenza di una regione enhancer, assente in  $\beta$ , e di una sequenza che stabilizza il trascritto di  $\alpha'$ , anch'essa assente in  $\beta$  (probabilmente una regione di 560 pb nel primo esone del trascritto di  $\alpha'$  (Harada et al., 1989). Questa differenza di espressione è stata evidenziata anche in piante di tabacco trasformate (Bray et al., 1987).

Il livello di espressione della subunità  $\beta$ , a differenza della subunità  $\alpha'$ , è anche influenzato da stress abiotici, dal livello di metionina nel terreno e da presenza di ABA. Gli elementi fondamentali implicati nella regolazione a livello trascrizionale del gene per la subunità  $\alpha'$  sono raccolti nella regione di 905 pb in 5' rispetto al sito di inizio della trascrizione, regione detta URS (Upstream Regulatory Sequence). All'interno di questa zona sono state individuate sequenze specifiche con funzione di enhancer sito-specifico. Fra queste vi sono i legumin boxes (5'-CATGCAC.3' e 5'-CATGCAT-3'), elementi che si ritrovano in molti altri geni per proteine seme-specifiche, in particolare nei legumi. L'azione coordinata delle due sequenze determina un aumento di circa 10 volte



del livello di espressione del gene nel seme. La regolazione da parte di questi elementi sembra essere di tipo positivo (Chamberland et al. 1992), ma non sono stati ancora trovati elementi trans che interagiscano specificamente in questi siti.

L'espressione sito-specifica necessita anche dell'azione coordinata di elementi che agiscono in cis, che non sono ancora stati caratterizzati, situati nella regione in 5' rispetto ai "legumin boxes" e nella zona 3' del promotore (Chamberland et al., 1992). La zona in 5' contiene probabilmente un sito di regolazione negativa, specifico per un fattore nucleare presente solo in tessuti non-seme. Questo fattore determinerebbe l'espressione del gene solo in tessuti embrionali. E' stata dimostrata anche l'importanza delle sequenze CAAT e TATA nella regolazione della sito-specificità.

Sono stati identificati anche quattro fattori nucleari di soia che interagiscono con sequenze specifiche presenti nella URS del gene per  $\alpha'$  e  $\beta$ . Due di questi fattori embrionali, SEF3 e SEF4, si legano in siti all'interno della regione enhancer (da -257 a -79 ). SEF3 si lega al centro della sequenza 5'-AACCCA.....AACCCA-3', presente solo nel gene per la subunità  $\alpha'$ . L'accumulo e la

degradazione di questa proteina (SEF3) viaggia parallelamente all'accumulo e alla degradazione dell'mRNA di  $\alpha'$ , supportando l'ipotesi che SEF3 sia implicato nella regolazione dell'espressione di  $\alpha'$ . SEF4 è un fattore presente in quantità minore di SEF3, ha molti siti di riconoscimento (5'-A/GTTTTTA/G-3') in  $\alpha'$ , ma soprattutto in  $\beta$ . La presenza di questo fattore è correlata con la regolazione dell'espressione di  $\beta$  (Lessard et al., 1991). Esperimenti di delezione e mutagenesi sito-specifica hanno dimostrato che l'azione di questi fattori da soli non influisce nè sulla sito-specificità, nè sul livello di espressione, occorre infatti la coordinazione con l'attività degli altri elementi regolatori. Si pensa comunque che queste proteine abbiano un ruolo di regolazione solo in certe condizioni, in base alla omologia con proteine indotte dalla luce (Fujiwara e Beachy, 1994).

Fattori embrionali con comportamento simile a SEF3, verificato in esperimenti di gel shift, sono stati trovati anche in tabacco (Lessard et al., 1991). Questo ed altri dati ottenuti con saggi dell'attività glucuronidasica (GUS) sotto il controllo del promotore  $\alpha'$  di soia, dimostrano che

il meccanismo di regolazione sito- e stadio-specifico è conservato (Lessard et al, 1991; Riggs et al., 1989). Si pensa anche che fattori trans in tabacco che si leghino al promotore 35SCaMV, possano interagire anche con i legumin boxes (Katagiri et al., 1989). Nessuno dei fattori finora citati risulta essere direttamente responsabile della regolazione temporale, non si è trovato un fattore NRS-simile che abbia una regolazione negativa come in fagiolo (Bustos et al. 1991).

Studi più recenti, riguardanti alcune legumine e viciline in *Vicia faba*, smentiscono alcune generalizzazioni fatte sulla regolazione dell'espressione delle proteine di riserva dei semi (Wobus et al., 1995). Essi dimostrano che i geni delle legumine B4 e LeB4 di *Vicia faba* non sono espressi solo in tessuti embrionali, nè sono temporalmente ristretti alla fase di espansione cellulare durante l'embriogenesi. Le proteine sono accumulate per brevi periodi e poi degradate in tutti i tessuti embrionali, compreso il sospensore e l'endosperma, in precisi stadi di sviluppo. Questo probabilmente per permettere un rifornimento continuo all'embrione di composti ricchi di C e N durante tutte le fasi di crescita e di

differenziamento. Questi dati quindi fanno ipotizzare che l'espressione delle proteine dei semi sia regolata anche metabolicamente e non solo a livello di fasi di sviluppo. Si sta ora indagando sulla possibile relazione fra accumulo di proteine di riserva e metabolismo dei carboidrati (livello di zuccheri solubili). Poichè tutte le classi di proteine di riserva dei semi hanno un comportamento simile nelle varie specie, questi dati richiedono una attenta valutazione del comportamento, in termini di espressione, anche per le proteine di soia  $\beta$ -conglucina e globulina basica 7S. Dai dati ricavati dal lavoro riportato in questa invenzione risulta evidente la specificità tissutale dell'espressione della parte strutturale della lattoferrina sotto controllo di entrambi i promotori. La fase di attivazione invece non è stata al momento indagata in modo dettagliato perché interessava solo la capacità di accumulo totale nel seme. Per quanto riguarda in particolare la globulina basica 7S, essa è una proteina di riserva del seme di soia ricca di metionina e cisteina. Come la  $\beta$ -conglucina, anche la globulina basica 7S (Bg) è accumulata nel seme in grandi quantità (3% delle proteine totali del



seme). E' costituita da due subunità codificate dallo stesso mRNA, una di 27KDa e l'altra di 16KDa, legate da ponti disolfuro. La Bg è sintetizzata come unico polipeptide precursore, consistente in un putativo segnale peptidico e nelle due subunità. Tale polipeptide viene processato per dare la proteina dimerica matura. Il gene della Bg è presente nel genoma in circa quattro copie (Watanabe e Hirano, 1994).

Questa proteina è prevalentemente localizzata nei tessuti embrionali del seme ed il suo pattern di espressione è strano per una proteina di riserva. Infatti una parte di Bg si accumula negli spazi intercellulari del parenchima dei cotiledoni (Nishizawa et al., 1994), mentre a livello intracellulare si accumula in corpi proteici sulla lamella mediana della parete cellulare e nella membrana plasmatica (Watanabe e Hirano, 1994).

Questa localizzazione suggerisce che la Bg non sia una semplice proteina di riserva, ma abbia anche altre funzioni. Dati più precisi sulla localizzazione e sul periodo di espressione della Bg in soia non sono disponibili. Non è mai stato verificato se il meccanismo di espressione sito- e tempo-specifica è conservato in altre specie

vegetali trasformate (es. tabacco). Ci si riferisce per questo ai dati generali sulle proteine di riserva e a studi sull'analogo della Bg in lupino (conglutina  $\gamma$ ), con cui essa ha un'elevata omologia di sequenza. Questa proteina viene accumulata solo nei tessuti embrionali di lupino (cotiledoni ed asse embrionale) 40 giorni dopo la fioritura. Non è stata individuata in altri tessuti come foglie e germogli. In semi di tabacco transgenico, il gene della conglutina  $\gamma$  viene espresso in maniera crescente dal 15° al 20° giorno dopo la fioritura fino al 40°, poi comincia a decrescere (Ilgoutz et al., 1997).

Una delle caratteristiche peculiari della Bg è che essa viene secreta in grande quantità dai semi di soia quando vengono immersi in acqua a 40-60°C. Non si sa se le proteine secrete sono neosintetizzate al momento del trattamento a caldo o sono le proteine già presenti ad essere secrete. Dal momento che si è evidenziato anche un aumento dello specifico mRNA in seguito al riscaldamento, si pensa che la Bg sia effettivamente sintetizzata in seguito allo shock termico (Hirano et al., 1989).

Non si conosce molto sul meccanismo di regolazione dell'espressione del gene della proteina Bg, ma sono state identificate sequenze nella zona promotore implicate nella regolazione genica. Oltre alla sequenza CAAT box e TATA box, rispettivamente in posizione -116 e -25 rispetto al sito d'inizio della trascrizione, sono stati individuati tre elementi regolatori simili a sequenze enhancer termo-specifiche presenti nella regione 5' non trascritta di geni in altri organismi. Questi heat shock elements (HSE) sono composti da due unità di 5 pb conservate: 5'-NGAAN-3' e 5'-NTTCN-3'. Nel promotore termoregolato della proteina indotta da shock termico di soia, gli elementi enhancer, visti anche in Bg, cooperano sinergisticamente con tre sequenze CCAAT box presenti a monte aumentando l'espressione del gene; anche nel promotore di Bg sono presenti queste sequenze putative.

Non sono state identificate le sequenze responsabili della sito- e tempo-specificità dell'espressione.

L'interesse per questa proteina nasce dal fatto che viene accumulata nel seme di soia in quantità elevata (3% delle proteine totali) ed ha

quindi un promotore seme-specifico forte, che può garantire un elevato livello di espressione del gene da esso regolato. Si sa inoltre che il meccanismo di regolazione di questa proteina è diverso da quello delle altre proteine di riserva del seme di soia, ma non se ne conoscono i dettagli. Studi sul promotore e sul suo meccanismo di attivazione sito- e tempo-specifico non sono comunque mai stati condotti utilizzando geni reporter in piante transgeniche.

Sia la Bg che la CONG in quanto proteine di riserva vengono sintetizzate solo nei tessuti del seme e sono accumulate in grande quantità nelle cellule che compongono quest'organo, all'interno di precisi compartimenti. Per quanto riguarda il livello di regolazione post-trascrizionali e soprattutto post-traduzionali, esso passa attraverso i meccanismi di trasporto intracellulare e di compartimentalizzazione delle proteine, meccanismi per molti aspetti ancora da chiarire.

In questi meccanismi sono implicati infatti tutti i processi che influenzano la concentrazione, la ritenzione e lo smistamento delle proteine nel sistema di endomembrane (Okita, 1996).



Esistono comunque dei principi generali del targeting proteico validi per tutte le specie vegetali.

1. Le informazioni di indirizzamento risiedono nelle proteine stesse, sotto forma di segnali discreti. Questi segnali vengono intercettati da meccanismi di riconoscimento specifici che possono essere recettori o semplici interazioni con lipidi di membrana.

2. Esistono diversi tipi di segnali (sequenze topogeniche) ciascuno con funzione specifica. Fra questi vi sono sequenze-segnale, le quali danno inizio alla traslocazione della proteina attraverso endomembrane specifiche ed interagiscono con recettori/traslocatori che facilitano il trasferimento unidirezionale. Si trovano poi sequenze di stop e di ritenzione che bloccano il trasferimento nella membrana o all'interno del compartimento. Sequenze di selezione indirizzano le proteine verso i vari compartimenti cellulari.

Tutti questi elementi possono essere di tipo sequenziale, localizzati nella parte N-terminale, centrale o C-terminale della proteina, o conformazionali, cioè costituiti da aminoacidi non sequenziali, ma adiacenti nella conformazione

nativa della proteina. Vi possono essere inoltre più segnali contemporaneamente e possono essere modificati o attivati (esempio per fosforilazione).

Spesso il segnale viene deleto dopo il trasferimento utilizzando siti di taglio specifici per proteasi endogene.

Anche l'accumulo dell'mRNA in una particolare zona influenza la localizzazione della proteina. Le proteine di riserva dei semi di soia, sia globuline che lectine, vengono depositate in vacuoli di riserva. Esistono infatti diversi tipi di vacuoli, alcuni di questi, oltre ad avere la funzione di mantenimento della pressione di turgore e di regolare il rilascio di ioni, zuccheri ed aminoacidi, sono anche il compartimento di deposito di proteine di riserva e di difesa. La sequenza segnale specifica per l'indirizzamento al vacuolo non è ancora stata identificata, se non per alcune specie vegetali (Kermode, 1996). E' probabile che una o più regioni superficiali della proteina correttamente conformata siano riconosciute dal meccanismo di selezione. Caratteristica unica delle cellule vegetali è quella di accumulare le proteine di riserva nei corpi proteici. Negli animali invece simili corpi di inclusione vengono formati solo

quando si verifica un eccesso di sintesi proteica. Questi corpi proteici sono quindi agglomerati disordinati di proteine conformazionalmente non corrette o parzialmente processate. Nelle piante il processo di formazione e l'organizzazione dei corpi proteici non è chiaro, ma si sa che è costituito da una serie di eventi ordinati (Okita, 1996). Le globuline sono proteine con pI acido e quindi vengono traslocate nel RE e nel complesso di Golgi come proteine solubili. Appena giunte nel vacuolo, a causa del pH basso o forse dei processamenti e dell'assemblaggio, queste proteine precipitano formando addensamenti particolati che daranno origine poi ai corpi proteici (Kermode, 1996).

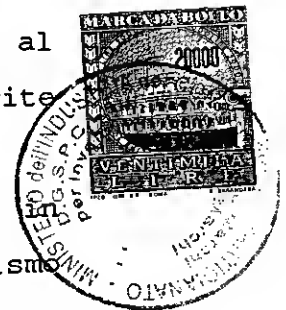
Nelle leguminose proteine di riserva diverse vengono accumulate negli stessi corpi proteici senza separazioni spaziali. In altre specie vegetali i corpi proteici si formano nel RE e vengono poi inglobati nel vacuolo per autofagocitosi (Kermode, 1996).

Questo schema generale è valido anche per la  $\beta$ -conglucininina, anche se per questa proteina non sono state identificate le sequenze specifiche di targeting al vacuolo. E' stato invece osservato il legame della  $\beta$ -conglucininina con una proteina

omologa alla BIP. Questa proteina funziona da chaperonina e, come per altre proteine in altre specie vegetali, può avere il ruolo di ritenere la  $\beta$ -conglucininina nel RE fino a che non ha raggiunto la corretta conformazione (Galili et al., 1993; Shewry et al., 1995; Kermode, 1996; Fontes et al., 1996). Per quanto riguarda la globulina basica 7S le informazioni sono poche. Si sa che è localizzata in corpi proteici sulla lamella mediana della parete cellulare e nella membrana plasmatica e non nei vacuoli (Watanabe, 1994). Per questo si ipotizza che il suo meccanismo di compartimentalizzazione sia diverso da quello della  $\beta$ -conglucininina. Si sa comunque che anche le proteine localizzate sulla parete seguono la stessa via di trasporto delle proteine vacuolari, cioè sono tradotte sul RE, poi vengono trasportate al Golgi ed infine secrete all'esterno o inserite nella membrana tramite traffico vescicolare.

L'espressione delle proteine di riserva ospiti eterologhi mostra comunque che il meccanismo di compartimentalizzazione è universale. In piante transgeniche le proteine di riserva del seme vacuolari vengono correttamente indirizzate.

Talvolta però il trasporto può non essere



efficiente soprattutto in organi vegetativi rispetto ai semi. In tabacco le proteine di riserva dei legumi vengono correttamente indirizzate ai vacuoli sia nei semi che nelle foglie, ma nelle foglie il livello di accumulo è minore. Questo perchè esiste una differenza nell'efficienza di trasporto oppure un diverso grado di processamento (proteasi diverse o maggiore instabilità). Si comprende quindi come la produzione seme-specifica di una proteina eterologa umana in pianta sia un meccanismo complesso, per cui un passaggio importante è la verifica preliminare sul funzionamento e la efficienza del sistema di espressione costruito in un organismo ospite modello.

Una delle piante maggiormente utilizzate a questo scopo come si è visto è il tabacco. Il suo utilizzo preferenziale nella sperimentazione deriva dal fatto che essa è una delle piante più conosciute sia da un punto di vista genetico che da un punto di vista biologico e fisiologico. Questo fatto unitamente alla facilità di operare la trasformazione genetica e la velocità del ciclo vegetativo l'ha resa quindi un modello importante per gli esperimenti biotecnologici, un modello sul

quale si è ormai acquisita esperienza sia per quanto riguarda i sistemi specifici di trasformazione che per quanto riguarda le condizioni di micropropagazione. Il tabacco presenta inoltre l'ulteriore vantaggio della quasi completa estendibilità dei risultati ottenuti a numerose altre specie vegetali, conseguente alla elevata conservazione dei meccanismi di regolazione genica, che si sono dimostrati molto conservati appunto in altre specie vegetali, ed in particolare nelle leguminose. Quindi si presta in particolare ad essere un modello particolarmente adatto per lo studio dei promotori da queste prelevati, ed in particolare della loro capacità di far esprimere in modo controllato un gene di interesse in una pianta trasformata.

I geni di interesse sono generalmente geni codificanti proteine utilizzabili in campo farmaceutico o alimentare. In questo senso un gene eterologo di interesse per questo tipo di applicazione è quello della lattoferrina umana, che è una proteina appartenente alla famiglia delle transferrine, e come tale è in grado di legare stabilmente ed in modo reversibile due ioni ferro.

La lattoferrina infatti è una proteina che in

5.8.75  
10/11/75

relazione alle sue funzioni biologiche, si rivela interessante sia dal punto di vista nutrizionale che farmacologico. Essa è presente nel latte umano e svolge un ruolo fondamentale nell'alimentazione dei neonati, infatti a questa proteina vengono riconosciute molteplici funzioni biologiche, fra cui un'attività battericida e batteriostatica contro una vasta gamma di microrganismi patogeni e la capacità di aumentare l'assorbimento del ferro a livello intestinale (Lonnerdal e Iyer, 1995; Hambraeus e Lonnerdal, 1993). Inoltre essa promuove la crescita cellulare, regola la mielopoiesi ed è in grado di modulare la risposta infiammatoria (Lonnerdal e Iyer, 1995; Oguchi et al. 1995; Penco et al. 1995).

In questo senso, si è in prima battuta tentato di ricercare una proteina capace di legare il ferro e che possieda queste proprietà nel latte di altri mammiferi.

Si è visto che il latte di tutti i mammiferi contiene due tipi di proteine capaci di legare il ferro, presenti in rapporti diversi: la transferrina, identica alla sierotransferrina, e la lattoferrina. Il latte umano è particolarmente ricco di lattoferrina, infatti la sua

concentrazione nel colostro è di 5-10 mg/ml, anche se decresce durante l'allattamento a circa 1 mg/ml nel latte maturo (Hambraeus e Lonnerdal, 1993). Nel latte di altre specie animali, come la capra, il cavallo, il maiale ed il topo, la quantità di lattoferrina è però molto più bassa. Nel latte bovino, ad esempio, la concentrazione è di circa 0,1 mg/ml. In alcune specie come il coniglio, il ratto ed il cane, la lattoferrina è assente e la proteina prevalente che lega il ferro è invece la transferrina.

Inoltre, la lattoferrina prodotta da specie di mammiferi diversi dalla specie umana, assume in ciascuna di esse caratteristiche strutturali e quindi proprietà diverse.

La lattoferrina umana (LFU) è una glicoproteina monomerica di 78 kDa, con struttura bilobata. Fra il dominio N-terminale e quello C-terminale vi è un elevato grado di omologia, sia a livello di sequenza aminoacidica (37%) che di struttura tridimensionale. La struttura tridimensionale è stata descritta nel dettaglio attraverso cristallografia a raggi X (Lonnerdal e Iyer, 1995). Il gene per la LFU è stato clonato e sequenziato. Si conoscono anche i meccanismi di



regolazione genica a livello trascrizionale e traduzionale ed il ruolo degli estrogeni e del ferro in questi meccanismi (Liu et al, 1991). La proteina matura è costituita da una catena polipeptidica di 692 aa ed ha un pI = 8,8 - 9. Essa contiene 16 ponti disolfuro e mostra una certa resistenza alla proteolisi (Lommerdal, 1995), presenta tre catene glicaniche poli-acetilactosaminiche legate con legami N-glicosidici ai residui aminoacidici Asn233, Asn476 e Asn545 ed il peso molecolare della proteina glicosilata è di 82 KDa.

Una delle differenze più importanti fra le LF presenti nelle varie specie animali è proprio la composizione delle catene glicosidiche. Infatti la LF bovina, diversamente dalla LFU, contiene residui galattosidici  $\alpha$ -1,3 e glicani di tipo oligomannosidico; il ruolo delle catene glicosidiche non è ancora stato definito, tuttavia è possibile che i glicani proteggano la LFU contro attacchi di enzimi proteolitici.

Ciascuno dei due domini della LFU è in grado di legare strettamente, ma reversibilmente uno ione ferrico e contemporaneamente una molecola di ione carbonato o bicarbonato (Hambraeus e Lommerdal,

1993). I siti di legame per il ferro nella lattoferrina del latte umano non vengono saturati completamente, ma solo per il 6-8% della loro capacità (Stowell et al., 1991).

In questi anni, sono stati condotti una serie di studi mirati a comprendere i meccanismi di azione e la relazione fra struttura molecolare e funzione di questa proteina. La strategia adottata è stata quella di studiare molecole di LF alterate nella struttura attraverso mutagenesi sito-specifica. Si sono perciò cercati sistemi di espressione di LFU ricombinante che producessero, in modo semplice e poco costoso, una proteina identica il più possibile a quella purificata dal latte umano.

Tutti gli ospiti eterologhi fin qui utilizzati per la LFU ricombinante sono comunque eucarioti, dato che essendo una glicoproteina complessa, essa richiede un apparato di processamento evoluto.

Nel 1991 Stowell e collaboratori hanno clonato il gene della LFU in cellule renali di criceto neonato in coltura. Per massimizzare l'espressione è stato utilizzato un promotore  $Zn^{2+}$ -inducibile ed il segnale di secrezione di una proteina endogena di criceto. La concentrazione di LFU ricombinante

secreta nel mezzo di coltura è di circa 20 mg/l, sufficiente per la cristallizzazione e quindi per studi strutturali. La caratterizzazione di questa proteina ha rivelato che ha la stessa massa molecolare della LFU nativa e che conserva intatto il sito di legame al ferro. Le uniche differenze che essa presenta rispetto alla LFU del latte umano sono nelle catene glicosidiche e nella sequenza N-terminale, ma queste non influiscono sul folding.

Un simile sistema di espressione è molto costoso e non è adatto per la produzione di quantità di proteina richieste a livello industriale.

Successivamente la LFU è stata espressa nel latte di topi transgenici. In questo caso non si sono trasformate cellule in coltura, ma l'intero animale, utilizzando la sequenza regolatrice del gene bovino della caseina  $\alpha$ -S1. Si è dimostrato che l'mRNA di LFU viene espresso solo nelle ghiandole mammarie in femmine durante l'allattamento. La proteina nel latte raggiunge la concentrazione di 0,1-36  $\mu$ g/l. Recentemente questa LFU ricombinante è stata caratterizzata (Nuijens, 1997), e si è visto che presenta la stessa massa molecolare, la sequenza N-terminale e l'immunoreattività della LFU

nativa. Essa mantiene anche la capacità di rilasciare il ferro a pH acido ed il legame ai lipopolisaccardi batterici. Anche in questo caso la glicosilazione presenta delle differenze dalla LFU nativa, come anche l'azione battericida ed anti-infiammatoria in vivo.

Un sistema di produzione di LFU ricombinante di estrema rilevanza è sicuramente stato quello realizzato in *Aspergillus awamori* (Ward et al, 1995). Con questo metodo, che è coperto da brevetto, si ottengono quantità commerciali di LFU ricombinante (2 g/l). Per massimizzare l'espressione, la LFU viene prodotta come proteina di fusione con parte del gene strutturale, la sequenza di regolazione ed il segnale di secrezione nel mezzo di coltura della glucoamilasi. Il polipeptide di fusione viene processato per dare la LFU matura da una peptidasi endogena. La glucoamilasi è una proteina di *Aspergillus* espressa in grandi quantità.

Un ospite eucariotico alternativo è quello usato da Mitra e collaboratori nel 1994. Essi hanno trasformato cellule di tabacco in sospensione. Nei calli transgenici viene prodotta, in piccole quantità, una proteina molto più corta della LFU



nativa, che quindi si è dimostrata instabile. La LFU ricombinante ha attività contro batteri fitopatogeni, fra cui *Xantomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* ed altri. Nel lavoro citato non è riportato l'ottenimento di piante intere e fertili.

Recentemente la LFU è stata prodotta anche in cellule di insetto in coltura, utilizzando come sistema di espressione il Baculovirus (Salmon et al., 1997). Questo è un sistema di espressione molto potente e dà una proteina ricombinante identica alla nativa, tranne che per il livello di glicosilazione. Essa mantiene comunque il legame con i ricettori specifici.

Tutti i sistemi di espressione sopra riportati permettono di ottenere una quantità di proteina sufficiente per studi funzionali ed in alcuni casi anche per utilizzi commerciali (*Aspergillus*). In quest'ultimo caso però l'utilizzo sicuro della proteina purificata, per esempio in preparati sostitutivi del latte in neonati, richiede una purificazione spinta onde garantire l'assenza di sostanze immunogeniche o allergeniche. Non sono comunque mai state utilizzate piante transgeniche a questo scopo, nè sono mai stati realizzati prodotti

utilizzabili direttamente per l'alimentazione umana, per esempio attraverso l'espressione di LFU ricombinante in piante alimentari.

#### Sommario dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce ad un sistema generale di accumulo tessuto specifico ed in particolare seme specifico di proteine eterologhe, studiato e realizzato allo scopo di massimizzarne la produzione prevenendo la loro degradazione mediante utilizzo delle sequenze leader e i promotori dei geni Bg e  $\beta$  conglucininina. A questo fine la parte strutturale del gene scelto potrà codificare per proteine ad attività enzimatica, utilizzate in terapia umana o in processi industriali, o proteine con attività farmacologica generale (lattoferrina) o specifica (anticorpi o antigeni) o proteine anticorpali per la fitodepurazione o per l'eliminazione di micotossine presenti negli alimenti.

La presente invenzione si riferisce in particolare ad un sistema che consentendo la espressione tessuto specifica in pianta del gene della lattoferrina umana, fornisce una importante soluzione al problema della produzione di questa

proteina. Tale sistema infatti, determina la produzione di piante in grado di esprimere quantità relativamente elevate di questa proteina che, nella forma di realizzazione preferita, che prevede la espressione di un gene sintetico progettato dagli inventori in modo da massimizzarne la espressione in pianta, raggiunge livelli industrialmente rilevanti. Tali piante transgeniche inoltre consentono di evitare i costosi procedimenti di purificazione del prodotto, potendo essere utilizzati come *nutraceuticals*, ed essere quindi assunte direttamente come alimenti. In questo senso ne è possibile anche l'uso per la produzione di farine proteiche o estratti proteici, ricavati da tessuti ed in particolare da seme delle piante trasgeniche su menzionate, per la produzione di cibi funzionali o preparati speciali per l'infanzia. Tali piante possono essere comunque utilizzate anche per la purificazione di lattoferrina umana, tramite metodi convenzionali basati su tecniche cromatografiche.

Questo sistema di espressione prevede inoltre l'utilizzo di nuovi vettori ricombinanti, costruiti verificando l'effetto di diverse sequenze segnale e diversi siti di processamento della proteina

9.11.83  
11.11.83

matura, che consentono la produzione di una qualsiasi proteina di interesse ed in particolare della lattoferrina o di frammenti da essa derivati, con un accumulo tessuto specifico della proteina, in piante appartenenti a diverse famiglie tra cui le leguminose, i cereali, le solanacee, le piante da frutto e le orticole in genere. Essi in particolare sono strutturati in modo da presentare i seguenti componenti funzionalmente legati: (a) un promotore; (b) una sequenza segnale (o "leader"); (c) una sequenza nucleotidica ottimizzata per l'espressione in pianta e corrispondente alla sequenza aminoacidica della lattoferrina umana intera o a frammenti di questa; (d) un segnale di poliadenilazione.

In particolare è considerato il caso in cui si tratta di plasmidi, ed in cui gli elementi di regolazione e le sequenze di segnale utilizzati sono quelli appartenenti a due geni che codificano per proteine di riserva molto abbondanti nei semi di soia e cioè una  $\beta$ -conglucininina ed una globulina basica 7S, isolate e clonate dalla varietà di soia Richland. Essi possono essere utilizzati per la trasformazione di cellule vegetali sia con il metodo dell'Agrobacterium, sia con metodi fisici



diretti (Gelvin e Schilperoort, 1995; DuPont Biolistic Manual, DuPont). Le cellule vegetali trasformate sono quindi selezionate con l'apposito agente selettivo e indotte a formare piante intere fertili in grado di formare semi e questi di esprimere il gene lattoferrina e di accumulare questa come proteina di riserva.

Questo risultato è stato ottenuto disegnando e sintetizzando un gene artificiale che codifica per la stessa sequenza amminoacidica del gene umano naturale ma presenta delle mutazioni nella sequenza tali che i codoni più frequentemente utilizzati dalla cellula umana, sono sostituiti con quelli più frequentemente usati dalla cellula vegetale. Questo risultato si è concretizzato nel cambiamento del 31% dei codoni del gene originale (vedi tabella 1 infra). La notevole produzione di lattoferrina umana riscontrata nelle varie piante trasformate con il gene sintetico, con produzioni che vanno dall'1% al 1,8% del totale delle proteine di riserva del seme, ma non nelle piante con il gene naturale, ne ha dimostrato la funzionalità in pianta.

In relazione a tutto quanto esposto, oggetto della presente invenzione è un polinucleotide

codificante per la lattoferrina umana, caratterizzato dal fatto di avere una sequenza totalmente o parzialmente corrispondente alla sequenza riportata come SEQ ID NO:1, e dal fatto che detta sequenza è ottimizzata per la espressione in pianta, ed in particolare il caso in cui detto polinucleotide presenta fusa alla parte 5' terminale una sequenza scelta dal gruppo comprendente le sequenze rappresentate come SEQ ID NO: 13 e NO: 14.

Oggetto della presente invenzione è anche la proteina lattoferrina umana, ottenuta dalla espressione delle sequenze su citate.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è un vettore a DNA ricombinante, in particolare un plasmide, comprendente almeno una sequenza di un gene di interesse, in particolare il gene codificante per la lattoferrina umana completa, specificamente la sequenza totalmente o parzialmente corrispondente alla SEQ ID NO:1, operativamente collegata ad elementi di regolazione che consentono la espressione tessuto specifica di detto gene. Caso particolare è quello in cui tali elementi di regolazione sono costituiti da una

"cassetta di espressione per piante" che consente la espressione tessuto specifica di detto gene.

Ulteriori casi di interesse sono quelli in cui la "cassetta di espressione" per piante è costituita dagli elementi di regolazione della proteina Globulina basica 7S, ed in particolare quando tra detti elementi di regolazione vi è la sequenza del promotore riportata come SEQ ID NO:21, oppure dagli elementi di regolazione della proteina  $\beta$ -conglucininina, ed in particolare quando tra detti elementi di regolazione vi è la sequenza del promotore riportata come SEQ ID NO:22, il caso in cui la sequenza del gene codificante totalmente o parzialmente per la lattoferrina umana è operativamente collegata o anche fusa, ad una sequenza segnale (o "leader"), ed il caso in cui tale sequenza segnale è scelta dal gruppo comprendente le sequenze riportate come SEQ ID NO: 13 e NO: 14.

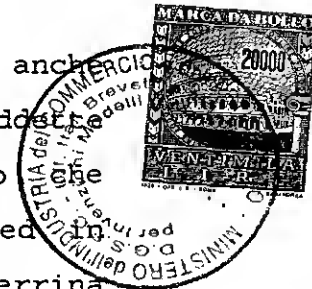
Particolare importanza riveste il caso in cui tale plasmide è scelto dal gruppo comprendente i vettori pBI, pGEM o pUC.

Costituisce oggetto della presente invenzione anche il procedimento di trasformazione di cellule vegetali in cui la trasformazione è effettuata con

uno dei vettori su menzionati, le cellule vegetali transgeniche ottenibili tramite la trasformazione di cellule vegetali di tipo selvatico con almeno uno degli stessi vettori, e le cellule che comunque contengono un gene di interesse, o sue porzioni, ed in particolare il gene codificante per la lattoferrina umana operativamente collegato ad una "cassetta di espressione", che consente la espressione tessuto specifica del gene stesso, in particolare quella del gene codificante per la Globulina basica 7S e del gene codificante per la  $\beta$ -conglucina.

Costituiscono inoltre oggetto della presente invenzione "aggregati cellulari" ed in particolare calli, caratterizzati dal fatto di essere ottenibili dalle suddette cellule.

Oggetto della presente invenzione sono anche le piante transgeniche ottenibili dalle suddette cellule tramite tecniche convenzionali, o che comunque contengono un gene di interesse ed in particolare il gene codificante per la lattoferrina umana, specificamente quello la cui sequenza corrisponde alla SEQ ID NO:1, operativamente collegato ad una "cassetta di espressione" che



consente la espressione tessuto specifica del gene stesso.

Particolare rilevanza riveste il caso in cui tali piante transgeniche sono scelte dal gruppo comprendente solanacee, cereali, leguminose, orticole e piante da frutto in genere, in particolare la soia, il tabacco e il riso, laddove il gene codificante per la lattoferrina è espresso specificamente nei tessuti di riserva o nel frutto. Ulteriore oggetto della presente invenzione è l'uso di tali piante transgeniche come nutraceuticals.

Costituiscono oggetto della presente invenzione i procedimenti di produzione di cibi funzionali contenenti proteine prodotte dalle suddette piante transgeniche, di latti vegetali, a partire da proteine in forma naturale e/o in concentrato derivate dalle su menzionate piante, e comunque qualsiasi procedimento di produzione di lattoferrina umana, caratterizzato dal fatto di utilizzare le suddette piante.

Oggetto della presente invenzione è infine anche la lattoferrina umana ottenuta dalle suddette piante transgeniche.

L'invenzione verrà meglio descritta con l'aiuto delle figure annesse.

### Descrizione delle figure

La figura 1 mostra la strategia seguita per l'assemblaggio del gene sintetico per la lattoferrina umana.

La figura 2 mostra la mappa dei plasmidi pGEM-PGLOB(A) e pGEM-PCONG (B) ottenuti dal clonaggio dei promotori di soia nel plasmide pGEM (Promega), in cui sono evidenziati i siti di restrizione utilizzati per derivare i plasmidi.

La figura 3 mostra l'analisi elettroforetica condotta su gel di agarosio della digestione dei plasmidi pGEM-PGLOB con Sal I (linee 1, 2, 3 e 4) e pGEM-PCONG CON Sph I (linee 6, 7, 8 e 9), posta in essere per verificare l'orientamento dell'inserito in direzione oraria. Tutti i campioni PGLOB sono risultati positivi dando i frammenti delle dimensioni attese. PGLOB 1 è il campione 1 scelto per il lavoro molecolare successivo. I campioni PCONG invece non hanno dato il pattern previsto suggerendo la possibilità di trovarsi in presenza di errori dovuti alla tecnica di clonaggio usata (ipotesi scartata successivamente, vedi figura 6) oppure dovuta all'isolamento di una variante della regione di regolazione che nella varietà Richland è

diversa da quella della sequenza pubblicata (varietà Dare). Il campione 5 è il marcatore lambda HindIII.

La figura 4 mostra l'analisi elettroforetica su gel di agarosio della restrizione di due cloni del plasmide pGEM-PCONG con gli enzimi Nde I (linee 1 e 2), Rsa I (linee 3 e 4), e SnaB I (linee 9 e 10) condotta allo scopo di verificare l'orientamento e l'identità dei costrutti. I tagli con Nde I, Apa I e SnaB I danno i pattern attesi a differenza del taglio operato con Rsa I; questi risultati sono giustificati dalle differenze di sequenza riscontrate e riportate in figura 6. In posizione 5 e 6 sono presenti i marcatori di peso molecolare  $\lambda$ -DNA Hind III e Marker IV (Boehringer) rispettivamente.

La figura 5 mostra l'analisi elettroforetica della restrizione di diversi cloni del plasmide pGEM-PCONG con gli enzimi Rsa I (linee 1-6) e Hinf I (linee 9-14) per la verifica dell'identità dei costrutti. In entrambi i casi i pattern ottenuti non rispecchiano quelli attesi, ma sono conservati tra i diversi cloni suggerendo che siano pertanto dovuti a differenze nella sequenza originale rispetto alla mappa di restrizione depositata e non

ad errori nella fase di amplificazione con la Taq polimerasi o di clonaggio. I marcatori usati sono  $\lambda$ -DNA Hind III e Marker IV.

La figura 6 mostra il confronto tra la sequenza pubblicata della regione promotore del gene CONG con quella clonata nel plasmide pGEM-PCONG.

La figura 7 mostra una rappresentazione schematica dei due plasmidi risultanti dal clonaggio del gene naturale LFU nei due vettori pGEM-T e pBI121, per dare luogo a plasmidi utilizzati successivamente come controllo della trasformazione.

La figura 8 mostra la mappa dei due plasmidi risultanti dal clonaggio del gene LFU sintetico nei vettori pGEM-PGLOB e pGEM-PCONG e cioè rispettivamente i plasmidi pGEM-PGLOB-LFU (A) pGEM-PCONG-LFU (B).

La figura 9 mostra la mappa dei plasmidi pBI-PGLOB-LFU (A) e pBI-PCONG-LFU (B) in cui sono evidenziati i siti di restrizione utilizzati. In particolare il riquadro (A) mostra la costruzione del plasmide contenente il gene sintetico rappresentato nella lista di sequenze come SEQ ID NO:1 e clonato nel plasmide pBI101 fuso al



promotore PGLOB ed in "fase di lettura aperta" con il segnale della globulina basica 7S.

Il riquadro (B) invece mostra la costruzione del plasmide contenente il gene sintetico riportato nella lista di sequenze come SEQ ID NO: 1 e clonato nel plasmide pBI101 fuso al promotore PCONG e in "fase di lettura aperta" con il "leader" della  $\beta$ -coglicinina.

La figura 10 mostra l'analisi elettroforetica della restrizione di diversi cloni del plasmide pBI-PCONG-LFU con gli enzimi Xba I, BamH I, Sac I; i campioni 4 e 5 risultano positivi. In posizione 6 è presente il marcatore di peso molecolare Ladder 1Kb.

La figura 11 mostra l'analisi elettroforetica della restrizione di due cloni del plasmide pBI-PCONG-LFU con gli enzimi Sal I (linee 1 e 2) e con Xba I e Sac I (linee 4 e 5); entrambi i campioni sono positivi. I campioni 3 e 6 rappresentano i controlli positivi e cioè pGEM-PCONG-LFU digerito rispettivamente con Sal I, con Xba I e Sac I.

La figura 12 mostra l'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR da DNA genomico estratto da diverse piante trasformate con pBI-PGLOB-LFU, condotta utilizzando i primers PLT48

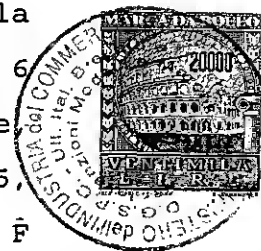
e PLT49 per la sequenza promotore PGLOB. I campioni positivi 2, 3, 4 e 5 mostrano la banda del DNA amplificato a 1500 bp, mentre i campioni 6, 7 e 8 rappresentano rispettivamente il controllo negativo di PCR ed il controllo positivo (pGEM-PGLOB). In posizione 1 e 9 si trovano i marcatori di peso molecolare Ladder 1Kb.

La figura 13 mostra nel riquadro (A) il gel di agarosio con il DNA genomico di tabacco trasformato con pBI-PCONG-LFU (linee 1-5) o con pBI-PGLOB-LFU (linee 6-9) tagliato con l'enzima BamH I. M è il marcatore di peso molecolare Ladder 1 Kb. Il campione 10 mostra il controllo positivo pGEM-LFU, non visibile nella foto per motivi quantitativi. Nel riquadro (B) è mostrato il pattern di ibridazione della sonda LFU sul DNA genomico delle stesse piante di tabacco; i campioni 1, 2 e 3, rispettivamente appartenenti alle piante PCONG 1, PCONG 3, e PCONG 4 sono positivi così come i campioni 5, 7 e 8, rispettivamente appartenenti alle piante PGLOB 10, PGLOB 3 e PGLOB 4. E' evidente che pGEM-LFU, il controllo positivo (linea 10), è stato solo parzialmente digerito in quanto sono presenti anche le forme superavvolte del plasmide.

La figura 14, mostra l'analisi elettroforetica SDS-PAGE di proteine parzialmente purificate da semi delle piante transgeniche verificate con il Southern della figura precedente (A) e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando anticorpi policlonali specifici per la lattoferrina umana (B). In particolare nel riquadro (A) è mostrata l'analisi elettroforetica SDS-PAGE di proteine totali cellulari da semi maturi (30 DAP) di tabacco transgenico. In posizione 2, 3, 4 e posizione 5, 6, 7 si trovano gli stessi campioni risultati positivi al Southern blot, estratti con un tampone rispettivamente a pH 2,7 e pH 7,6. I campioni 8 e 10 rappresentano il controllo positivo (lattoferrina umana estratta da latte, Sigma) e controllo negativo (pianta non trasformata della stessa varietà), mentre in posizione 9 si trova il marcatore di peso molecolare Rainbow (Amersham). Nel riquadro (B) è mostrata l'autoradiografia dell'ibridazione dell'anticorpo anti-lattoferrina con le stesse proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa-DEAE; il campione corrispondente alla pianta PGLOB 10, in posizione 2 e 5, non dà un segnale positivo, anche se dall'analisi Southern

risulta essere trasformato. Tutti gli altri campioni risultano positivi.

La figura 15 mostra l'analisi elettroforetica di proteine grezze estratte da foglie e semi di tabacco transgenico trasformato con i plasmidi di cui alla figura 9. In particolare nel riquadro (A) è riportata la colorazione delle proteine operata con Blue di Comassie. Nel riquadro (B) è riportato il Western Blotting eseguito con anticorpi specifici per LFU sulle proteine del gel mostrato nel riquadro (A) dopo trasferimento su membrana. In particolare nella linea 1 è riportata la pianta PGLOB 1, con proteine estratte da foglia, nella linea 2 è riportata sempre la pianta PGLOB 1, con proteine estratte da seme, nella linea 3 è riportata la pianta PGLOB 3, proteine da foglia, nella linea 4 è riportata la pianta PGLOB 3, proteine da seme, nella linea 5 è riportata la pianta PCONG 105, proteine da foglia, nella linea 6 è riportata la pianta PCONG 105, proteine da seme, nella linea 7 è riportata la pianta PCONG 105, proteine da seme, trattate con N-deglicosilasi  $\hat{F}$  (vedi testo), nella linea 8 è riportato il marcatore di peso molecolare, nella linea 9 è riportata la LFU presente in commercio trattata con



N-deglicosilasi F, nella linea 10 è riportata la LFU presente in commercio.

La figura 16 mostra l'analisi Western della proteina LFU estratta da latte umano e della proteina ricombinante isolata da seme di tabacco, prima e dopo trattamento con l'enzima N-deglicosilasi F. L'analisi è eseguita con anticorpi specifici per la lattoferrina umana. Nella linea 1 è riportata la proteina LFU estratta e purificata, mediante HPLC, da seme della pianta PCONG 105; nella linea 2 è riportata la proteina come in 1, dopo trattamento con N-deglicosilasi F per 18 ore; nella linea 3 è riportata la proteina LFU commerciale dopo trattamento con N-deglicosilasi F per 18 ore; nella linea 4 è riportata la LFU presente in commercio, si può notare la diminuzione di peso molecolare dei due campioni (2 e 3) trattati con l'enzima.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

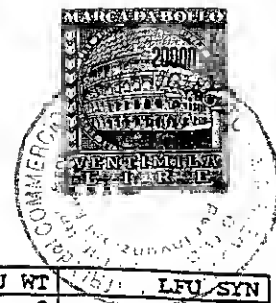
La strategia seguita per la generazione di piante transgeniche in grado di produrre lattoferrina umana, è stata sviluppata in due direzioni: da una parte, sono state svolte analisi comparative sui sistemi di espressione di vegetali,

in particolare modo di tabacco e soia, sulla cui base operare la progettazione di una sequenza codificante per la lattoferrina umana, ottimizzata per massimizzarne la espressione in vegetali. In tal senso nella progettazione della sequenza si è tenuto conto della necessità che alla proteina tradotta potessero essere apportate le necessarie modifiche post-traduzionali per la produzione nella forma nativa, e che, sia per conformazione che in seguito alla localizzazione sub-cellulare, la proteina fosse sufficientemente stabile da poter essere accumulata in quantità significative nelle piante trasformate. Questo si è dimostrato di fondamentale importanza dopo aver verificato, a seguito di diversi tentativi eseguiti negli anni scorsi, l'impossibilità di produrre la proteina Lattotferrina umana in pianta utilizzando sia sistemi di espressione costitutiva (esempio con il promotore 35S) sia con promotori inducibili a seguito di taglio delle foglie. Inoltre, oltre alle difficoltà legate al tipo di promotore utilizzato, si è verificato che il livello di produzione della proteina e la sua stabilità in pianta erano scarse e dipendenti da un uso preferenziale distorto dei codoni tra il gene umano e le piante.

E' stato quindi sviluppato un sistema di vettori plasmidici, che contenevano un gene lattoferrina sintetizzato ex novo posto sotto controllo di promotori tessuto e stadio specifici, in grado di consentire una espressione elevata del gene e accumulare in modo efficiente e stabile la proteina in organi di riserva del seme. Inoltre la scelta delle sequenze leader e la progettazione del punto di fusione tra queste e la parte strutturale della proteina matura ha consentito di ottenere una proteina lattoferrina che, in termini quantitativi ma non è da escludere anche qualitativi, presenta lo stesso livello di glicosilazione della proteina nativa e la stessa sequenza aminotermine, importante per alcune caratteristiche funzionali della stessa.

Per quanto riguarda la progettazione del gene sintetico si sono modificate tutte le triplette necessarie e possibili tenendo conto dell'uso preferenziale di queste nelle due piante di riferimento tabacco e soia. Sono stati in particolare utilizzati i dati esposti nella tabella 1.

TABELLA 1



Codon	Uomo	Soia	Tabacco	LFU WT	LFU SYN
ARG CGA	5.6	4.5	4.8	3	3
CGC	11.2	7.5	3.8	5	5
CGG	10.7	2.2	2.2	7	3
CGT	4.6	7.4	7.7	4	8
AGA	9.8	14.8	12.5	13	16
AGG	10.8	11.3	12.1	13	10
LEU CTA	6.1	7.0	7.4	0	2
CTC	20.1	16.2	12.7	10	9
CTG	42.1	10.3	7.1	28	8
CTT	10.8	23.7	21.8	9	19
TTA	5.4	8.4	10.3	2	2
TTG	11.1	20.5	20.7	9	18
SER TCA	9.7	14.7	15.8	5	11
TCC	17.8	9.5	10.0	13	7
TCG	4.1	4.3	4.3	2	2
TCT	13.3	17.3	20.6	10	14
AGC	18.7	16.8	9.0	13	9
AGT	9.9	14.0	11.9	8	8
THR ACA	14.3	14.9	16.4	8	8
ACC	22.6	14.0	11.9	9	7
ACG	6.6	3.2	4.0	2	2
ACT	12.6	17.4	20.4	12	14
PRO CCA	15.4	30.6	26.2	6	12
CCC	20.6	10.5	9.0	10	5
COG	6.8	4.6	3.2	6	4
CCT	16.1	22.2	21.7	13	14
ALA GCA	14.4	20.5	22.3	12	18
GCC	29.7	16.6	16.2	25	16
GCG	7.2	4.7	4.4	8	8
GCT	18.9	23.2	35.2	18	21
GLY GGA	17.4	22.7	31.4	11	21
GGC	25.3	11.9	14.0	24	8
GGG	17.5	11.0	10.0	12	8
GGT	11.5	22.1	30.0	6	16
VAL GTA	6.1	7.5	11.5	2	3
GTC	16.2	9.0	13.8	7	6
GTG	30.7	25.8	14.4	28	18
GTT	10.2	24.4	29.4	5	15
LYS AAA	21.9	23.2	23.2	22	22
AAG	35.2	35.2	30.7	23	23
ASN AAC	22.3	29.2	26.0	17	17
AAT	16.5	20.2	27.8	14	14
GLN CAA	10.8	27.4	22.5	8	14
CAG	33.8	20.7	14.1	21	15
HIS CAC	14.7	8.9	8.9	4	4
CAT	9.3	12.1	11.1	5	5
GLU GAA	26.4	34.6	26.7	16	18
GAG	41.6	35.8	26.2	21	19
ASP GAC	28.9	18.8	17.2	22	16
GAT	21.5	29.7	33.0	16	22
TYR TAC	18.0	17.1	16.6	12	12
TAT	12.3	16.2	20.6	9	9
CYS TGC	13.8	9.9	8.1	17	17
TGT	9.9	5.5	10.1	15	15
PHE TTC	22.1	23.5	18.1	17	15
TTT	15.8	19.3	25.2	10	12
ILE ATA	6.1	12.2	10.7	4	4
ATC	24.3	15.0	13.7	7	5
ATT	15.0	23.7	29.4	5	7
MET ATG	22.3	20.1	22.8	4	4
TRP TGG	13.7	11.5	13.7	10	10

Nel fare questo si è tenuto anche nella giusta considerazione il valore G+C e A+T dei due sistemi (uomo e vegetale), della non ripetizione contigua di alcune triplette che possono portare a fenomeni di slittamento di lettura, ecc.

Il gene LFU sintetico è stato quindi ottenuto utilizzando i primer riportati nella lista di sequenze annesse da SEQ ID NO:8 a SEQ ID NO:12 e da sequenza SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 20 e seguendo la strategia di assemblaggio riportata in figura 1 che consisteva nell'eseguire ripetuti cicli di PCR, utilizzando per ogni ciclo diverse coppie di primers sintetici che consentissero l'allungamento progressivo e la formazione della sequenza finale come progettata.

Parallelamente è stato anche clonato il gene LFU nativo (wild type) che codifica per la lattoferrina umana, sempre con tecnica PCR, a partire da una libreria a cDNA di tessuto mammario umano (Clontech). Il gene è stato recuperato nella sua parte strutturale priva del peptide segnale e del sito poli-A e clonato in pGEM-T a formare il plasmide pGEM-LFU la cui mappa è rappresentata in figura 7. I primer disegnati per l'amplificazione sono riportati, nella lista di sequenze annessa,

alle sequenze SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3; questi aggiungevano all'estremità 5' il sito di restrizione BamHI e in 3' il sito di restrizione SacI. Il gene naturale ottenuto, dopo controllo della sequenza, che è risultata identica a quella pubblicata, è stato clonato nel vettore pBI121, nei siti BamHI e SacI, sotto controllo del promotore 35S (vedi figura 7), questo plasmide (pBI-LFU) è stato successivamente indicato come pBI-35S-LFU e utilizzato come controllo negli esperimenti di trasformazione genetica delle piante e successiva analisi molecolare e biochimica.

Per quanto riguarda la preparazione dei vettori ricombinanti contenenti gli elementi che consentono la espressione tessuto specifica del gene LFU in "cassette di espressione per piante", si è proceduto come segue. Al fine di ottenere l'espressione seme-specifica della proteina si sono utilizzati i promotori e le sequenze segnale appartenenti a due geni che codificano per proteine di riserva molto abbondanti nei semi di soia e cioè una  $\beta$ -conglitinina (CONG) e una globulina basica 7S (GLOB).

Queste sequenze di regolazione sono state isolate e clonate dalla varietà di soia Richland.

In particolare per il clonaggio delle due sequenze GLOB e CONG è stata utilizzata la tecnica della reazione di polimerizzazione a catena (PCR = Polimerase Chain Reaction; Innis et al. 1990). In questo caso si è utilizzato DNA genomico estratto da foglie di soia delle cultivar Richland. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione specifica sono riportati nella lista di sequenze annessa da SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 7.

Per il promotore GLOB la regione clonata comprende tutta la sequenza regolatrice e la sequenza che codifica per il peptide segnale (leader) più il primo codone della sequenza strutturale, tale sequenza è indicata come SEQ ID NO: 13 nella lista di sequenze annessa. Per il promotore CONG la regione clonata comprende tutta la sequenza regolatrice e la sequenza che codifica per il peptide segnale più il primo codone della sequenza strutturale, tale sequenza è indicata come SEQ ID NO: 14 nella lista di sequenze annessa. Per entrambe le sequenze di regolazione il sito di restrizione più idoneo da inserire è risultato XbaI (TCTAGA), mentre a valle è risultato BamHI (GGATCC), entrambi assenti nella sequenza della

1991.11.18  
1991.11.18

lattoferrina, sia naturale che sintetica come viene  
evidenziato nelle seguenti tabelle 2 e 3.

TABELLA 2

	0	1000	2000
AccI	1	+	+
AlwI	2	+	+
AlwNI	1	+	+
AosI	1	+	+
AvaI	4	+	+
AvaII	6	+	+
BalI	2	+	+
BanI	4	+	+
BanII	2	+	+
BbvI	8	+	+
BcnI	5	+	+
BglI	3	+	+
BglII	2	+	+
BsmI	1	+	+
Bsp1286	8	+	+
BspMI	1	+	+
BstUI	1	+	+
BstXI	3	+	+
Bsu36I	1	+	+
DdeI	8	+	+
DpnI	5	+	+
DraII	2	+	+
DraIII	2	+	+
EaeI	3	+	+
Eco81I	1	+	+
EcoNI	2	+	+
EcoO109	2	+	+
EcoRI	1	+	+
EcoRV	1	+	+
Fnu4HI	10	+	+
FokI	6	+	+
FspI	1	+	+
HgiAI	3	+	+
HhaI	4	+	+
HinfI	6	+	+
HinPII	4	+	+
HpaII	6	+	+
HphI	3	+	+
MaeI	3	+	+
MaeII	2	+	+
MaeIII	8	+	+
MboII	3	+	+
NciI	5	+	+





1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* contents were determined by the method of Arar and Parsons (1972). The *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* contents were expressed as  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the extract.

TABELLA 3

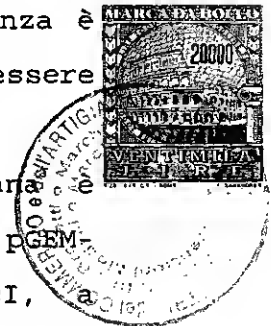
	0	1000	2000
AccI	1	+	+
AccIII	1	+	+
AluI	10	+	+
AlwI	5	+	+
AosI	2	+	+
AsuI	7	+	+
AvaII	6	+	+
AvrII	1	+	+
BanI	2	+	+
BanII	2	+	+
BbvI	3	+	+
BcnI	2	+	+
BglI	2	+	+
BglII	2	+	+
BsmI	2	+	+
Bsp1286	5	+	+
BspMI	3	+	+
BspMII	1	+	+
BstNI	6	+	+
BstUI	1	+	+
BstXI	3	+	+
Bsu36I	1	+	+
Cfr13I	7	+	+
DdeI	7	+	+
DpnI	8	+	+
DraII	1	+	+
DraIII	2	+	+
Eco81I	1	+	+
EcoNI	1	+	+
EcoO109	1	+	+
EcoRI	1	+	+
EcoRII	6	+	+
EcoRV	1	+	+
Fnu4HI	4	+	+
FokI	5	+	+
FspI	2	+	+
HaeIII	4	+	+
HgiAI	2	+	+
HhaI	3	+	+
HincII	1	+	+
HindIII	1	+	+
HinfI	8	+	+
HinPII	3	+	+

Enzyme	Number of sites	Restriction sites
HpaII	3	+
HphI	3	+
MaeI	5	+
MaeII	2	+
MaeIII	9	+
MboII	6	+
MseI	2	+
NciI	2	+
NcoI	3	+
NdeI	1	+
NlaIII	8	+
PleI	3	+
PpuMI	1	+
PstI	2	+
PvuII	2	+
RsaI	2	+
Sau3AI	8	+
Sau96I	7	+
SauI	1	+
ScrFI	8	+
SfaNI	4	+
SspI	2	+
StyI	5	+
TaqI	2	+
XhoII	6	+

Il DNA stampo è stato estratto da foglie di Glycine max varietà Richland e i prodotti dell'amplificazione corrispondono alle dimensioni attese per il promotore GLOB (1515 pb) e CONG (1163) in base ai dati di sequenza EMBL.

A partire dai frammenti amplificati, mediante ligazione nel vettore pGEM-T, sono stati quindi costruiti i due vettori pGEM-PGLOB e pGEM-PCONG la cui mappa è riportata in figura 2. I plasmidi ottenuti sono stati controllati mediante analisi di restrizione con diversi enzimi scelti fra quelli che tagliano in numero limitato e con distribuzione su tutta la sequenza (vedi figure 3, 4 e 5) e un clone per tipo è stato scelto e sequenziato. I cloni sequenziati si sono rilevati significativamente diversi dalla sequenza attesa. In figura 6 viene riportato, come esempio, il confronto della sequenza del promotore CONG presente in banca dati con quella ottenuta sequenziando il clone pGEM-PCONG, la differenza è pari al 5% e quindi i due promotori possono essere considerati diversi.

Il gene sintetico per la lattoferrina umana è stato clonato prima nei plasmidi pGEM-PGLOB e pGEM-PCONG, tagliati con gli enzimi BamHI-SacI,



5.13.  
5.14.

formare i plasmidi pGEM-PGLOB-LFU e pGEM-PCONG-LFU rispettivamente, la cui mappa è esposta in figura 8, e poi il tratto XbaI-SacI trasferito nel vettore pBI101 tagliato con gli stessi enzimi. Nel caso di trasformazione dei vegetali con metodi fisici, come da noi eseguito per il riso, e qui non riportato, è possibile utilizzare direttamente i plasmidi pGEM-PGLOB-LFU e pGEM-PCONG-LFU, dopo aver aggiunto un terminatore, in cotrasformazione con un vettore contenente il marcatore di selezione (es. un vettore del tipo pUC contenente il gene per la resistenza all'Igromicina). I plasmidi risultanti pBI-PGLOB-LFU e pBI-PCONG-LFU, la cui mappa è riportata in figura 9, dopo accurato controllo mediante restrizione con diversi enzimi per verificare la corretta integrazione del tratto di DNA (figure 10 e 11), sono stati usati per la trasformazione genetica delle piante. I plasmidi pBI-35S-LFU, pBI-PGLOB-LFU e pBI-PCONG-LFU sono stati trasferiti in cellule del ceppo di *A. tumefaciens* EHA105, rese competenti, mediante elettroporazione. I ceppi con i tre plasmidi sono stati utilizzati per trasformare circa 450 dischi fogliari di tabacco var. Petit Avana. Dai calli formati sui dischi fogliari in presenza di

kanamicina si è indotta la formazione prima di germogli e poi di radici. Una volta radicate le piante sono state trasferite in vaso e per ogni costrutto si sono analizzate almeno 50 piante kanamicina resistenti.

Le piante  $T_0$  sono state controllate mediante tecnica PCR (figura 12), che ha consentito di verificare la presenza, all'interno del genoma delle piante analizzate, del gene lattoferrina; le piante  $T_1$  sono state controllate mediante analisi Southern (figura 13), che consente un controllo più preciso, della tecnica PCR, della presenza del transgene nel genoma e con analisi Western (figura 14) che consente di rilevare la presenza del prodotto genico e quindi la funzionalità del gene inserito.

Le piante con il gene LFU naturale sotto controllo del promotore 35S portavano tutte all'accumulo di una proteina, riconosciuta dagli anticorpi specifici per la LFU, di peso molecolare inferiore a 50 Kda. Questa proteina era presente nelle foglie giovani in piccola quantità e non era più evidenziabile nelle foglie completamente sviluppate. Le piante trasformate con i due costrutti pBI-PGLOB-LFU e pBI-PCONG-LFU producono

ed accumulano solo nel seme una proteina di peso molecolare pari a 82 Kda corrispondente alla proteina umana glicosilata come è risultato dall'analisi elettroforetica delle proteine estratte e dal relativo Western Blotting eseguito con anticorpi specifici per LFU (vedi figura 15). La presenza della proteina ricombinante solo nel seme e non nelle foglie è stata verificata in tutte le piante transgeniche esaminate (circa 50 per i due costrutti) con tecniche Western.

La proteina LFU ricombinante isolata da seme e purificata con tecniche HPLC si è dimostrata identica alla proteina naturale per quanto riguarda la sua capacità di legare il ferro e il suo effetto inibitore verso i ceppi batterici esaminati. Il trattamento con un enzima deglicosilante conferma la presenza di modificazioni posttraduzionali del tutto simili, al momento almeno in termini quantitativi, a quelle presenti nella lattoferrina nativa come evidenziato dall'analisi Western Blotting i cui risultati sono esposti in figura 16.

Dai risultati sopra riportati risulta quindi evidente che utilizzando il gene nativo, descritto in letteratura, per la lattoferrina umana sotto controllo dei promotori classici utilizzati per la

trasformazione genetica dei vegetali, non è possibile produrre la proteina umana lattoferrina in quantità significative, in forma stabile e con le modificazioni posttraduzionali tipiche di questa proteina.

Si è data finora della presente invenzione una descrizione di carattere generale. Con l'aiuto dei seguenti esempi verrà ora fornita una descrizione più dettagliata di sue specifiche forme di realizzazione, finalizzate a farne meglio comprendere scopi, caratteristiche, vantaggi e modalità operative.

#### ESEMPIO 1:

##### Trasformazione del tabacco mediata da Agrobacterium Tumefaciens

1° giorno: in 2 ml di LB sterile, è stata inoculata una piccola quantità di Agrobatterio tumefaciens del ceppo EHA 105, prelevata da una coltura su piastra petri con un'ansa sterile, in modo da non eccedere nella quantità per evitare successi problemi di controllo di proliferazione batterica sui dischi fogliari su piastra. Successivamente è stata prelevata da una pianta sana di tabacco varietà Petit Avana, una foglia che non presentava



alterazioni di sorta e che manifestava per converso condizioni ottimali di turgore. La foglia è stata sciacquata brevemente in acqua bidistillata per eliminare le impurità superficiali, immersa in una soluzione di sodio ipoclorito 20 % e SDS 0,1 % per 8 min, e lasciata asciugare sotto cappa a flusso verticale. Da questo momento, tutte le operazioni sono state eseguite sotto cappa. In particolare la foglia è stata immersa in etanolo 95 % e agitata in modo da bagnarne completamente le due pagine (lasciando fuori dal liquido il picciolo), per 30 - 40 sec. La foglia è stata poi lasciata asciugare perfettamente.

Con una punzonatrice sterilizzata in etanolo, sono stati ricavati dischetti da tutta la superficie fogliare, facendoli cadere su piastre con MS10 privo di antibiotici; in particolare non sono stati posti più di 30 dischetti per piastra. Successivamente 2 ml di LB + agrobatterio (appena inoculato) sono stati versati sulla piastra, e la sospensione batterica sparsa uniformemente su tutta la piastra con dolce movimento rotatorio, in modo da ottenere una omogenea distribuzione dei batteri tra i dischetti. L'eccesso di LB è stato aspirato con cura con una pipetta. Nello svolgimento di

1.2.  
P. 141

queste operazioni si è sempre avuto cura di eseguire un controllo negativo in parallelo con una piastra a cui non si aggiunge nulla, o solo LB.

Le piastre sono quindi state incubate per 24-48 ore a 28°C, ad illuminazione costante e la crescita dei batteri è stata indicata dalla comparsa di un sottile alone opaco diffuso su tutta la piastra.

#### 2° Giorno

I dischi fogliari(=LD) sono stati trasferiti con cura su una piastra con MS10 + cephotaxime 500 mg/l, e incubati per 6 giorni a 28°C, in illuminazione costante. Questo passaggio determina la inattivazione dell'agrobatterio.

#### 8° giorno

I dischi fogliari sono stati quindi trasferiti con cura su MS10 + cephotaxime 500 mg/l e Kanamicina 200 mg/l, ed incubati per 14 giorni a 28°C, in illuminazione costante. Questo passaggio ha determinato la selezione delle piante trasformate: il gene della resistenza alla Kanamicina è infatti portato dal plasmide inserito in Agrobacterium.

#### 22° Giorno

I dischi fogliari che nel frattempo si sono accresciuti, formando callo, sono stati trasferiti con cura su MS10 + cephotaxime 500 mg/l, Kanamicina

200 mg/l e carbenicillina 500 mg/l, e incubati per 6 giorni. Questo passaggio determina la eliminazione degli agrobatteri eventualmente sopravvissuti ai precedenti trattamenti con antibiotico (caso molto frequente).

#### 28° Giorno

I dischi fogliari sono stati nuovamente trasferiti su MS10 + cephotaxime 500 mg/l e kanamicina 200 mg/l, ed incubati fino alla comparsa dei germogli. Quando i germogli presentavano almeno due foglie, sono stati separati dalla massa callosa e trasferiti sul terreno per la radicazione: MS0 + cephotaxime 500 mg/l e kanamicina 200 mg/l.

Al momento della comparsa delle radici, le piantine sono state estratte dalla piastra, liberate dai residui di agar, sciacquate delicatamente in acqua corrente e poste a dimora in piccoli vasi di plastica, in terriccio e sabbia (2:1). Il terreno è stato preventivamente saturato d'acqua, in seguito i vasetti sono stati coperti con coperchi di plastica trasparente per mantenere condizioni di elevata umidità, e sono stati posti in camera di crescita a temperatura ambiente, con un periodo giornaliero di illuminazione di 16 ore.

## ESEMPIO 2:

Purificazione della proteina lattoferrina da tessuti diversi della pianta e verifica del peso molecolare.

L'estrazione di tutte le proteine del seme di tabacco è stata eseguita macinando i semi in azoto liquido in presenza di un tampone di estrazione (0,5 M saccaroso, 0,1% acido ascorbico, 0,1% Cys-HCl, 0,01 M Tris-HCl, 0,05M EDTA pH 8).

La soluzione veniva poi centrifugata per 30 minuti a 14.000 g a 4°C e si conservava il surnatante con le proteine solubili.

La soluzione veniva poi filtrata con filtri di porosità 0,2 µm e la lattoferrina parzialmente purificata eliminando le proteine di peso molecolare inferiore a 30 KDa mediante centrifugazione in colonnina Centricon 30 (Amicon).

La lattoferrina veniva ulteriormente purificata mediante cromatografia HPLC su colonna Resource Q (Pharmacia) a scambio cationico debole, con eluizione in tampone fosfato pH 7 e gradiente NaCl 20-100%. Il picco corrispondente alla lattoferrina eluiva a 0,7 M NaCl.

Le frazioni del range di eluizione venivano



riunite e filtrate in Centricon 30 per eliminare il sale.

Per l'estrazione della lattoferrina dalle foglie di tabacco si procedeva come per l'estrazione da seme fino alla centrifugazione, il surnatante veniva poi addizionato di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% e lasciato in agitazione per 60 min in ghiaccio.

Si centrifugava poi la soluzione a 14.000 g per 15 minuti a 4°C e si recuperava il precipitato poi risospeso in tampone fosfato pH 6,8.

Per la verifica del peso molecolare in SDS-PAGE, al campione di lattoferrina (20µl) si aggiungeva il colorante (SDS loading buffer) e si caricavano i campioni su minigel di poliacrilamide all'8%. Le condizioni di corso erano: 10mA iniziali e 20 mA per tutta la corsa, in tampone Tris-glicina 1x. Il gel veniva poi colorato con tecnica Silver staining e il peso molecolare calcolato in riferimento a standard di peso molecolare.

#### ESEMPIO 3:

Analisi Western delle proteina lattoferrina prodotta in pianta e deglicosilazione della stessa.

La lattoferrina purificata da seme secondo l'esempio 2, dopo separazione elettroforetica in gel di acrilamide, veniva trasferita mediante elettroblotting (tampone 25mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanolo, 45 V a 4°C) su membrana di nitrocellulosa (BA85 Schleicher e Schull).

La membrana con la proteina immobilizzata veniva posta in agitazione per 60 min in soluzione TBS-T e 5% Skin milk e successivamente, dopo alcuni lavaggi, con la stessa soluzione contenete l'anticorpo primario in proporzione 1:2500.

Dopo la reazione con l'anticorpo primario la membrana veniva lavata e poi posta a contatto dell'anticorpo secondario (Anti-Rabbit peroxidase coniugate), sempre in soluzione TBS-T Skin milk, in proporzione 1:12.000.

Dopo la reazione con l'anticorpo secondario la membrana veniva lavata diverse volte e posta a contatto le soluzioni del kit ECL per chimioluminescenza della Amersham.

La membrana veniva poi esposta a contatto con una lastra fotografica (Hyperfilm MP, Amersham) in camera oscura per tempi variabili.

La deglicosilazione con l'enzima N-glicosidase F (Boehringer Man.) veniva eseguito utilizzando 10

14

µl di volume di glicopeptide (10 µg) denaturato in 0,1% SDS portato a ebollizione per 2 min.

A questa soluzione si aggiungevano 90 µl di tampone (20 mM tampone fosfato pH 7,2, 50 mM EDTA pH 8, 10 mM sodio azide, 0,5% NP40, 1% β-mercaptoetanol) e si portava ancora una volta a ebollizione per 2 min e poi si raffreddava a 37°C.

Ai 100 µl si aggiungeva 1 U di N glicosidase F e si lasciava incubare a 37°C per 18 ore. Il prodotto della reazione veniva poi analizzato su gel SDS-PAGE e la proteina lattoferrina rilevata mediante tecnica Western.

#### GLOSSARIO

Il termine "polinucleotide ricombinante", come qui utilizzato per caratterizzare un polinucleotide utile per la produzione di lattoferrina, si riferisce ad un polinucleotide di origine genomica, cDNA, semisintetico o sintetico che, in virtù della sua origine o manipolazione: 1) non è associato con una parte o con la totalità del polinucleotide con il quale esso è associato in natura, e/o 2) è legato ad un polinucleotide che è diverso da quello al quale è associato in natura o che 3) non esiste in natura.

Il termine "polinucleotide", come qui utilizzato, si riferisce ad una forma polimerica di nucleotidi di qualsiasi lunghezza, sia ribonucleotidi che deossiribonucleotidi. Questo termine si riferisce unicamente alla struttura primaria della molecola. Così, il termine include DNA a singola e doppia elica così come RNA a singola e doppia elica. Esso include pure forme del polinucleotide modificate, per esempio per metilazione, fosforilazione o "capping", e forme non modificate.

Una "cassetta di espressione per piante" si riferisce ad una sequenza polinucleotidica ricombinante ottenuta legando assieme in modo operativo diversi elementi costituiti dalle sequenze polinucleotidiche che determinano l'espressione di un carattere in pianta, e che sono facilmente trasferibili, come tratti discreti, da un vettore all'altro mediante restrizione enzimatica.

Un "vettore" è un replicone in cui un altro segmento polinucleotidico viene aggiunto, in modo che si effettui la replicazione e/o espressione del segmento stesso.

Un "replicone" è qualsiasi elemento genetico, per esempio un plasmide, un cromosoma, un virus, che



1984 08

1984 08

si comporta come un'unità autonoma di replicazione polinucleotidica all'interno di una cellula; è quindi capace di replicarsi in modo autonomo.

"Sequenza di controllo" si riferisce a sequenze polinucleotidiche che sono necessarie ad effettuare l'espressione e/o la secrezione di sequenze codificanti a cui esse sono legate. La natura di queste sequenze di controllo differisce a seconda dell'organismo ospite; nei procarioti, queste sequenze di controllo generalmente includono promotore, sito di legame dei ribosomi e terminatori; negli eucarioti, generalmente queste sequenze di controllo includono promotori, terminatori e, in alcuni casi, gli enhancers. In aggiunta, sia nei procarioti che negli eucarioti, sequenze leader controllano la secrezione da parte della cellula ospite del polipeptide espresso. Il termine "sequenze di controllo" include, come minimo, tutti i componenti la cui presenza è necessaria per l'espressione, e può anche includere componenti addizionali la cui presenza è vantaggiosa, ad esempio sequenze leader.

Una sequenza "leader" è un tratto polinucleotidico, solitamente breve, che codifica per un segnale di trasporto della proteina a questo

fusa e che guida il trasferimento della proteina in compartimenti specifici della cellula. Se il trasferimento avviene attraverso il reticolo endoplasmico la proteina subisce specifiche modifiche posttrascrizionali.

"Legato operativamente" si riferisce ad una giustapposizione in cui i componenti sopra descritti sono in una relazione tale da permettere loro di funzionare nel modo atteso. Una sequenza di controllo "legata operativamente" ad una sequenza codificante è legata in tale modo che l'espressione della sequenza codificante si realizza in condizioni che sono compatibili con le sequenze di controllo.

Una "sequenza di lettura aperta" (*open reading frame, ORF*) è una regione di una sequenza polinucleotidica che codifica per un polipeptide; questa regione può rappresentare una porzione di sequenza codificante o una sequenza codificante completa.

Una "sequenza codificante" è una sequenza polinucleotidica che è trascritta in mRNA e/o tradotta in polipeptide quando posta sotto controllo di appropriate sequenze di regolazione. Gli estremi della sequenza codificante sono determinati da un codone di inizio della traduzione all'estremità 5' e

da un codone di arresto della traduzione all'estremità 3'. Una sequenza codificante può includere, ma non si limita a , mRNA, cDNA, e sequenze polinucleotidiche ricombinanti.

"Cellule ospiti ricombinanti", "cellule ospiti", "cellule", "linee cellulari", "colture cellulari" ed altri termini che denotano microorganismi o linee cellulari di eucarioti superiori, coltivate come entità unicellulari, sono qui utilizzati in modo intercambiabile. Essi si riferiscono a cellule che possono essere, o sono state, usate come ospiti per vettori ricombinanti o altri polinucleotidi di trasferimento, e includono la progenie della cellula che è stata in origine trasformata. E' implicito che la progenie di una singola cellula parentale può non essere necessariamente identica dal punto di vista morfologico e genetico al parentale originario, a causa di mutazioni accidentali o deliberate. Le progenie della cellula parentale che sono sufficientemente simili al progenitore e possono essere caratterizzate per la proprietà saliente, come la presenza di una sequenza nucleotidica codificante per il peptide di interesse, sono

incluse nella progenie intesa in questa definizione e rientrano negli stessi termini.

Per "aggregato cellulare" si intende un insieme di cellule non strutturate in un tessuto organizzato ma frutto di una proliferazione indifferenziata di cellule mantenute in particolari condizioni di concentrazione ormonale.

"Trasformazione", come qui utilizzato, si riferisce all'inserzione di un polinucleotide esogeno in una cellula ospite, indipendentemente dal metodo usato per l'inserzione stessa, ad esempio acquisizione diretta, infezione con *Agrobacterium*, gamma. Il polinucleotide esogeno può essere mantenuto come vettore non integrato, per esempio un plasmide o, in alternativa, può integrarsi nel genoma dell'ospite.

Come qui utilizzato, il termine "polipeptide" si riferisce al prodotto aminoacidico di una sequenza codificata all'interno di un genoma e non si riferisce alla lunghezza specifica del prodotto: così, peptidi, oligopeptidi e proteine sono inclusi nella definizione di polipeptide. Questo termine non si riferisce alle modificazioni post-espressione del polipeptide, per esempio glicosilazione, acetilazione, fosforilazione, sialilazione e simili.



Un "polipeptide naturale", (wild type), presenta una sequenza amminoacidica identica a quella codificata nel genoma dell'organismo che è la sorgente della sequenza codificante.

"Lattoferrina nativa" e termini analoghi si riferiscono alla lattoferrina isolata dalla sorgente in cui essa è normalmente prodotta in natura da un genoma naturalmente presente.

Un "polipeptide non nativo" si riferisce ad un polipeptide che è prodotto in un ospite diverso da quello da cui è prodotto in natura.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rice D.W., Baker E.N. 1989. J. Mol. Biol. 209:711-734.
- Baeuerle P.A. 1995. Nature 373:661-662.
- Bezault J.A., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P. 1994. Cancer Res. Baltimore 54:2310-2312.
- Boesman Finkelstein M., Sciortino C.V., Finkelstein R.A., Spik G., Montreuil J., Chrichton R.R., Mazurier J. 1985. Proc. 7th Int. Conf. Prot. Iron Metab. 251-260.
- Bray E., Naito S., Pan N., Anderson E. Dubé P.H., Beachy R.N. 1987. Planta 172:364-370.

- Bustos M.M., Begum D., Kalkan F.A. Batraw M.J., Hall T.C. 1991. EMBO J. 10:1469-1479.
- Chamberland S., Daigle N., Bernier F. 1992. Plant Mol. Biol. 19:937-949.
- Fontes E.P.B., Silva C.J., Carolino S.M.B., Figueiredo J.E.F., Batista D.P.O. 1996. Braz. J. Genetics 19:305-312.
- Fraley R., Schell J. (eds.) 1991. Curr. Opinion Biotechnol, 2:145-210.
- Fujiwara T., Beachy R.N. 1994. Plant Mol. Biol. 24:261-272.
- Galili G., Altschuler Y., Levanony H. 1993. Trends in Cell Biol. 3:437-442.
- Gelvin S.B., Schilperoort R.A. 1995. Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Acad. Pub., London.
- Glick B.R., Pasternak J.J. 1994. Molecular Biotechnology. ASM Press, Washington, p. 113.
- Grover M., Giouzeppos O., Schnagl R.D., May J.T. 1997. Acta Paediatr. 86:315-316.
- Hambræus L., Lonnerdal B. 1993. Indigenous Antimicrobial Agents in Milk-Recent Developments. Pp.97-107.
- Harada J.J., Barker S.J., Goldberg R.B. The Plant Cell, 1:415-425.

11/11/97  
7:00 PM

- He J., Fumanski P. 1995. Nature 373:721-724.
- Hirano H., Kagawa H., Okubo K. 1989. 31:731-735.
- Ilgoutz S.C., Knittel N., Min Lin J., Sterle S., Gayler K.R. 1997. Plant Mol. Biol. 34:613-627.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. 1990. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York.
- Kagawa H., Yamauchi F., Hirano H. 1987. FEBS Lett. 226:146-149.
- Katagiri F., Lam E., Chua N.H. 1989. Nature 340:727-730.
- Kermode A.R. 1996. Critical Rev. In Plant Sciences, 15:285-423.
- Komatsu S., Hirano H. 1991. FEBS Lett. 294:210-212.
- Lessard P.A., Allen R.D., Bernier F., Crispino J.D., Fujiwara T., Beachy R.N. 1991. Plant Mol. Biol. 16:397-413.
- Lonnerdal B., Iyer S. 1995. Ann. Rev. Nutr. 15:93-110.
- Mann D.M., Romm E., Migliorini M. 1995. J. Biol. Chem. 269:23661-23667.
- Marchetti M., Longhi C., Conte M.P., Pisani S., Valenti P., Seganti L. 1996. Antiviral Res. 29:221-231.

- Miehlike S., Reddy R., Osato M.S., Ward P.P.,  
Conneely O.M., Graham D.Y. 1996. J. Clin.  
Microbiol. 34:2593-2594.
- Mitra A., Zhang Z. 1994. Plant Physiol. 106:977-  
981.
- Naito S., Dubé P.H., Beachy R.N. 1988. Plant Mol.  
Biol. 11:109-123.
- Nakajima M., Shinoda I., Samejima Y., Miyauchi  
H., Fukuwatari Y., Hayasawa H. 1997. J. Cell  
Physiol. 170:101-105.
- Nishizawa N.K., Mori S., Watanabe Y., Hirano H.  
1994. Plant Cell Physiol. 35:1079-1085.
- Nuijens J.H., van Berkel P.H., Geerts M.E.,  
Hartevelt P.P., de Boer H.A., van Veen H.A. 1997.  
J. Biol. Chem. 272:8802-8807.
- Oguchi S., Waker W.A., Sanderson I.R. 1995. Biol.  
Of the Neonate, 67:330-339.
- Okita T.W. 1996. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant  
Mol. Biol. 47:327-350.
- Owen M.R.L., Pen J. 1996. Transgenic plants:  
production system for industrial and  
pharmaceutical proteins. J. Wiley e Sons, New  
York.
- Paule-Eugene N., Dugas B., Kolb J.P., Damais C.,  
Braquet P., Paubert-Braquet M., Rialland J.P. 1993.



513  
514

Comp. Rendus Acad. Sci., Series 3, Sci. De la Vie, 316:113-119.

- Penco S., Pastorino S., Bianchi-Scarra G., Garre C. 1995. J. Biol. Chem. 270:12263-12268.

Perez-Grau L., Goldberg R.B. 1989. The Plant Cell, 1:1095-1109.

- Petschow B.W., Talbott R.D. 1991. Pediatric Res. 29:208-213.

- Riggs C.D., Voelker T.A., Chrispeels M.J. 1989. Plant Cell, 1:609-621.

- Salmon V., Legrand D., Georges B., Slomianny M.C., Coddeville B., Spik G. 1997. Protein Expr. Purif. 9:203-210.

- Samaranayake Y.H. et al. 1997. APIMIS, 105:875-883.

- Shewry P.R., Napier J.A., Tatham A.S. 1995. The Plant Cell, 7:945-956.

- Soukka T., Lumikari M., Tenovuo J. 1991. Microbial Ecol. In Health and Dis. 4:259-264.

- Steiner T.S. et al. 1997. Clin. Diagn. Lab. Imm. 4:719-722.

- Stowell K.M., Rado T.A., Funk W.D., Tweedie J.W. 1991. Biochem. J. 276:349-355.

- Superti F., Ammendolia M.G., Valenti P., Seganti L. 1997. Med. Microb. Imm. 186:83-91.

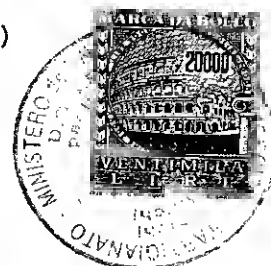
- Swart P.J., Kuipers M.E., Smit C., Pawels R., De Bethune M.P., De Clercq E., Meijer D.K.F., Huisman J.G. 1996. AIDS Res, and Human Retroviruses, 12:769-775.
- Teraguchi S., Ozawa K., Yasuda S., Shin K., Fukuwatari Y., Shimamura S. 1994. Biosc. Biotech. And Biochem. 58:482-487.
- Teraguchi S., Shin K., Ozawa K., Nakamura S., Fukuwatari Y., Tsuyuki S., Namiyara H., Shimamura S. 1995. Appl. Env. Microb. 61:501-506.
- Tomita M. 1993. Ind. Antimicrob. Agents of Milk-Recent Develop. pp.7-12.
- Van Berkel P.H.C., Geerts M.E.J., van Veen H.A., Mericskay M., De Boer H.A., Nuijens J.H. 1997. Biochem. J. 328:145-151.
- Ward P., Lo J.Y., Duke M., May G.S., Headon D.R., Conneely O.M. 1992. BioTechn. 10:784-789.
- Ward P., Piddington C.S., Cunningham G.A., Zhou X., Wyatt R.D., Conneely O.M. 1995. BioTechn. 13:498-503.
- Ward P., Zhou X., Conneely O.M. 1996. J. Biol. Chem. 271:12790-12794.
- Watanabe Y., Barbashov S.F., Komatsu S., Hemmings A.M., Miyagi M., Tsunasawa S., Hirano H. 1994. Eur. J. Biochem. 224:167-172.

- Watanabe Y., Hirano H. 1994. Plant Physiol. 105:1019-1020.
- Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. 1992. Recombinant DNA. W.H. Freeman and Co. New York, p. 213.
- Wobus U., Borisjuk L., Panitz R., Manteuffel R., Baumlein H., Wohlfahrt T., Heim U., Weber H., Misera S., Weschke W. 1995. J. Plant Physiol. 145:592-599.

## LISTA DI SEQUENZE

## INFORMAZIONI GENERALI:

- (i) DEPOSITANTE: PLANTECHNO S.R.L.
- (ii) TITOLO DELL'INVENZIONE:  
"POLINUCLEOTIDE SINTETICO CODIFICANTE PER LA  
LATTOFERRINA UMANA, VETTORI, CELLULE E PIANTE  
TRANSGENICHE CHE LO CONTENGONO"
- (iii) NUMERO DI SEQUENZE: 22
- (iv) INDIRIZZO DI CORRISPONDENZA:
  - (A) DESTINATARIO: Società Italiana Brevetti
  - (B) INDIRIZZO: Piazza di Pietra, 39
  - (C) CITTÀ: Roma
  - (D) PAESE: Italia
  - (E) CODICE POSTALE: I-00186
- (v) FORMA LEGGIBILE AL CALCOLATORE:
  - (A) TIPO DI SUPPORTO:
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatibile
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS Rev. 5.0
  - (D) SOFTWARE: Microsoft Word 6.0
- (viii) INFORMAZIONI SULL'AGENTE
  - (A) NOME: BORRINI, Stefano (Dott.)
  - (B) RIFERIMENTO: IN-SB
- (ix) INFORMAZIONI PER TELECOMUNICAZIONI
  - (A) TELEFONO: 06/6785941
  - (B) TELEFAX: 06/6794692
  - (C) TELEX: 612287 ROPAT



(1) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 1:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 2079 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: doppia

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: DNA

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: LFUSYN

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 1:

GGC CGT AGG AGA AGG AGT GTT CAA TGG TGC GCA GTA TCA CAA CCA	45
G R R R R S V Q W C A V S Q P	
GAG GCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATG AGA AAA GTT	90
E A T K C F Q W Q R N M R K V	
CGT GGA CCT CCT GTA TCT TGC ATA AAG AGA GAT TCA CCC ATC CAG	135
R G P P V S C I K R D S P I Q	
TGT ATC CAG GCA ATT GCG GAA AAC AGA GCT GAT GCT GTG ACT CTT	180
C I Q A I A E N R A D A V T L	
GAT GGT GGT TTC ATA TAC GAG GCA GGA CTT GCC CCA TAC AAA CTG	225
D G G F I Y E A G L A P Y K L	
CGA CCT GTA GCG GCG GAA GTC TAC GGG ACC GAA AGA CAA CCA CGA	270
R P V A A E V Y G T E R Q P R	
ACT CAC TAT TAT GCT GTG GCT GTT GTG AAG AAG GGC GGA TCT TTT	315
T H Y Y A V A V V K K G G S F	
CAG CTG AAC GAA CTT CAA GGT CTG AAG TCA TGC CAC ACA GGA CTT	360
Q L N E L Q G L K S C H T G L	
CGC AGG ACC GCT GGA TGG AAT GTC CCT ATA GGG ACA CTT CGT CCA	405
R R T A G W N V P I G T L R P	
TTC TTG AAT TGG ACG GGT CCA CCT GAG CCC ATT GAG GCA GCT GTG	450
F L N W T G P P E P I E A A V	

GCA	AGA	TTC	TTC	TCA	GCC	TCT	TGT	GTT	CCA	GGT	GCA	GAT	AAA	GGA	495
A	R	F	F	S	A	S	C	V	P	G	A	D	K	G	
CAA	TTC	CCC	AAC	CTT	TGT	CGC	CTG	TGT	GCG	GGG	ACA	GGG	GAA	AAC	540
Q	F	P	N	L	C	R	L	C	A	G	T	G	E	N	
AAA	TGT	GCA	TTC	TCA	TCC	CAG	GAA	CCG	TAC	TTC	AGC	TAC	TCT	GGT	585
K	C	A	F	S	S	Q	E	P	Y	F	S	Y	S	G	
GCC	TTT	AAG	TGT	CTT	AGA	GAC	GGT	GCT	GGA	GAT	GTT	GCT	TTT	ATT	630
A	F	K	C	L	R	D	G	A	G	D	V	A	F	I	
AGA	GAG	AGC	ACA	GTG	TTT	GAG	GAT	CTT	TCA	GAC	GAG	GCT	GAA	AGG	675
R	E	S	T	V	F	E	D	L	S	D	E	A	E	R	
GAC	GAG	TAT	GAG	TTA	CTC	TGC	CCA	GAC	AAC	ACT	CGT	AAG	CCA	GTT	720
D	E	Y	E	L	L	C	P	D	N	T	R	K	P	V	
GAC	AAG	TTC	AAA	GAT	TGC	CAT	CTT	GCA	CGG	GTC	CCT	TCT	CAT	GCC	765
D	K	F	K	D	C	H	L	A	R	V	P	S	H	A	
GTT	GTG	GCA	CGA	AGT	GTT	AAT	GGA	AAG	GAG	GAT	GCC	ATC	TGG	AAT	810
V	V	A	R	S	V	N	G	K	E	D	A	I	W	N	
CTT	CTC	CGC	CAA	GCA	CAG	GAA	AAG	TTT	GGA	AAG	GAC	AAG	TCA	CCG	855
L	L	R	Q	A	Q	E	K	F	G	K	D	K	S	P	
AAA	TTC	CAG	CTC	TTT	GGT	TCC	CCT	AGT	GGG	CAG	AAA	GAT	CTT	CTG	900
K	F	Q	L	F	G	S	P	S	G	Q	K	D	L	L	
TTC	AAG	GAC	TCT	GCC	ATT	GGG	TTT	TCG	AGA	GTG	CCA	CCT	AGG	ATA	945
F	K	D	S	A	I	G	F	S	R	V	P	P	R	I	
GAT	TCT	GGG	TTG	TAC	CTT	GGC	TCC	GGA	TAC	TTT	ACT	GCA	ATT	CAG	990
D	S	G	L	Y	L	G	S	G	Y	F	T	A	I	Q	
AAC	TTG	AGG	AAA	AGT	GAG	GAG	GAA	GTT	GCT	GCC	CGG	CGT	GCG	CGG	1035
N	L	R	K	S	E	E	E	V	A	A	R	R	A	R	
GTC	GTT	TGG	TGT	GCG	GTG	GGA	GAG	CAA	GAG	TTG	CGC	AAG	TGT	AAC	1080
V	V	W	C	A	V	G	E	Q	E	L	R	K	C	N	
CAG	TGG	AGT	GGT	TTG	AGC	GAA	GGA	TCT	GTG	ACC	TGC	TCA	TCG	GCC	1125
Q	W	S	G	L	S	E	G	S	V	T	C	S	S	A	
TCC	ACT	ACA	GAA	GAT	TGC	ATC	GCC	CTG	GTG	TTG	AAA	GGA	GAA	GCT	1170
S	T	T	E	D	C	I	A	L	V	L	K	G	E	A	
GAT	GCC	ATG	AGT	TTG	GAT	GGA	GGA	TAT	GTT	TAC	ACT	GCA	GGT	AAA	1215
D	A	M	S	L	D	G	G	Y	V	Y	T	A	G	K	
TGT	GGT	TTG	GTG	CCT	GTC	CTT	GCA	GAG	AAC	TAC	AAA	TCA	CAA	CAA	1260

C G L V P V L A E N Y K S Q Q  
 AGC AGT GAC CCT GAT CCT AAC TGT GTG GAT AGA CCT GTG GAA GGA 1305  
 S S D P D P N C V D R P V E G  
 TAT CTT GCT GTG GCG GTG GTT AGG AGA TCA GAC ACT AGC CTT ACC 1350  
 Y L A V A V V R R S D T S L T  
 TGG AAC TCT GTG AAA GGC AAG AAG TCC TGC CAC ACC GCC GTG GAC 1395  
 W N S V K G K K S C H T A V D  
 AGG ACT GCA GGT TGG AAT ATC CCC ATG GGA TTG CTC TTC AAC CAG 1440  
 R T A G W N I P M G L L F N Q  
 ACG GGC TCC TGC AAA TTT GAT GAA TAT TTC AGT CAA AGC TGT GCC 1485  
 T G S C K F D E Y F S Q S C A  
 CCT GGT TCT GAC CCA AGA TCT AAT CTC TGT GCT TTG TGT ATT GGA 1530  
 P G S D P R S N L C A L C I G  
 GAT GAG CAA GGT GAG AAT AAG TGC GTT CCC AAC AGC AAC GAG AGA 1575  
 D E Q G E N K C V P N S N E R  
 TAC TAC GGT TAC ACT GGG GCT TTC CGT TGC TTG GCT GAG AAT GCT 1620  
 Y Y G Y T G A F R C L A E N A  
 GGA GAC GTT GCA TTT GTG AAA GAT GTC ACT GTC TTG CAG AAC ACT 1665  
 G D V A F V K D V T V L Q N T  
 GAT GGA AAT AAC AAT GAG GCA TGG GCT AAG GAT TTG AAG CTT GCA 1710  
 D G N N N E A W A K D L K L A  
 GAC TTT GCG TTG CTG TGC CTC GAT GGC AAA CGT AAG CCT GTG ACT 1755  
 D F A L L C L D G K R K P V T  
 GAA GCT AGA AGC TGC CAT CTT GCC ATG GCC CCG AAT CAT GCT GTG 1800  
 E A R S C H L A M A P N H A V  
 GTG TCT CGT ATG GAT AAG GTG GAA CGC TTG AAA CAG GTG TTG CTC 1845  
 V S R M D K V E R L K Q V L L  
 CAC CAA CAG GCT AAA TTT GGT AGA AAT GGA TCT GAC TGC CCG GAC 1890  
 H Q Q A K F G R N G S D C P D  
 AAG TTT TGC TTA TTC CAG TCT GAA ACC AAA AAC CTT TTG TTC AAT 1935  
 K F C L F Q S E T K N L L F N  
 GAC AAC ACT GAG TGT CTT GCC AGA CTC CAT GGC AAA ACA ACA TAT 1980  
 D N T E C L A R L H G K T T Y  
 GAA AAA TAT TTG GGA CCA CAG TAT GTC GCA GGC ATT ACT AAT CTG 2025  
 E K Y L G P Q Y V A G I T N L

AAA AAG TGC TCA ACC TCC CCA CTC CTA GAA GCC TGT GAA TTC CTA 2070  
K K C S T S P L L E A C E F L



AGG AAG TAA

2079

R K \*

(2) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 2:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 30 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT46

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 2:

GGATCCATGG GCCGTAGGAG AAGGAGTGTT

30

(3) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 3:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 32 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 47

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 3:

GAGCTCCTTC GGTTTACTT CCTGAGGAAT TC

32

(4) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 4:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 42 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 48

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 4:

TCTAGATAAA ATAATCTATA CATTAAAAAA TTTGATTTTA AA 42

(5) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 5:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 36 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 49

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 5:

GGATCCGACT GAGTCGGATA AGAAGAAAAG AAAAGA

36

## (6) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 36 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 50

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 6:

TCTAGAGTTT TCAAATTTGA ATTTTAATGT GTGTTG 36

## (7) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 36 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 51

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO: 7:

GGATCCCACC TTAAGGAGGT TGCAACGAGC GTGGCA 36

## (8) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:8:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 250 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 120

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:8:

```

GGC CGT AGG AGA AGG AGT GTT CAA TGG TGC GCA GTA TCA CAA CCA GAG 48
GCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATG AGA AAA GTT CGT GGA 96
CCT CCT GTA TCT TGC ATA AAG AGA GAT TCA CCC ATC CAG TGT ATC CAG 144
GCA ATT GCG GAA AAC AGA GCT GAT GCT GTG ACT CTT GAT GGT GGT TTC 192
ATA TAC GAG GCA GGA CTT GCC CCA TAC AAA CTG CGA CCT GTA GCG GCG 240
GAA GTC TAC G                                                                 250

```

## (9) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:9:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

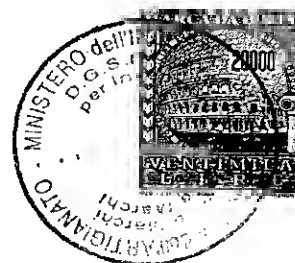
- (A) LUNGHEZZA: 250 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 121

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:9:



SIR  
20000

GC ACC TGG AAC ACA AGA GGC TGA GAA GAA TCT TGC CAC AGC TGC CTC 47  
 AAT GGG CTC AGG TGG ACC CGT CCA ATT CAA GAA TGG ACG AAG TGT CCC 95  
 TAT AGG GAC ATT CCA TCC AGC GGT CCT GCG AAG TCC TGT GTG GCA TGA 143  
 CTT CAG ACC TTG AAG TTC GTT CAG CTG AAA AGA TCC GCC CTT CTT CAC 191  
 AAC AGC CAC AGC ATA ATA GTG AGT TCG TGG TTG TCT TTC GGT CCC GTA 239  
 GAC TTC CGC CG 250

(10) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:10:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 253 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 122

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:10:

AAC TGG CTT ACG AGT GTT GTC TGG GCA GAG TAA CTC ATA CTC GTC 45  
 CCT TTC AGC CTC GTC TGA AAG ATC CTC AAA CAC TGT GCT CTC TCT 90  
 AAT AAA AGC AAC ATC TCC AGC ACC GTC TCT AAG ACA CTT AAA GGC 135  
 ACC AGA GTA GCT GAA GTA CGG TTC CTG GGA TGA GAA TGC ACA TTT 180  
 GTT TTC CCC TGT CCC CGC ACA CAG GCG ACA AAG GTT GGG GAA TTG 225  
 TCC TTT ATC TGC ACC TGG AAC ACA A 253

(11) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:11:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 255 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 123

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:11:

GTA CAA CCC AGA ATC TAT CCT AGG TGG CAC TCT CGA AAA CCC AAT GGC 48  
 AGA GTC CTT GAA CAG AAG ATC TTT CTG CCC ACT AGG GGA ACC AAA GAG 96  
 CTG GAA TTT CGG TGA CTT GTC CTT TCC AAA CTT TTC CTG TGC TTG GCG 144  
 GAG AAG ATT CCA GAT GGC ATC CTC CTT TCC ATT AAC ACT TCG TGC CAC 192  
 AAC GGC ATG AGA AGG GAC CCG TGC AAG ATG GCA ATC TTT GAA CTT GTC 240  
 AAC TGG CTT ACG AGT 255

## (12) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:12:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 251 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 124

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:12:

TA TCC TCC ATC CAA ACT CAT GGC ATC AGC TTC TCC TTT CAA CAC CAG 47  
 GGC GAT GCA ATC TTC TGT AGT GGA GGC CGA TGA GCA GGT CAC AGA TCC 95  
 TTC GCT CAA ACC ACT CCA CTG GTT ACA CTT GCG CAA CTC TTG CTC TCC 143  
 CAC CGC ACA CCA AAC GAC CCG CGC ACG CCG GGC AGC AAC TTC CTC CTC 191  
 ACT TTT CCT CAA GTT CTG AAT TGC AGT AAA GTA TCC GGA GCC AAG GTA 239  
 CAA CCC AGA ATC 251

## (13) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:13:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 75 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: doppia
- (D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (D) ALTRE INFORMAZIONI: sequenza "leader"

della proteina globulina basica 7S

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:13:

ATGGCTTCTA TCCTCCACTA CTTTTTAGCC CTCTCTCTTT CTGCTCTTT 50  
 TCTTTTCTTC TTATCCGACT CAGTC 75

## (14) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:14:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 191 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: doppia

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(D) ALTRE INFORMAZIONI: sequenza "leader"  
della proteina  $\beta$ -conglucininina

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:14:

```
ATGATGAGAG CGCGGTTCCC ATTACTGTTG CTGGGAGTTG TTTTCCTAGC 50
ATCAGTTTCT GTCTCATTTG GCATTGCGTA TTGGGAAAAG CAGAACCCCA 100
GTCACAACAA GTGCCTCCGA AGTTGCAATA GCGAGAAAGA CTCCTACAGG 150
AACCAAGCAT GCCACGCTCG TTGCAACCTC CTTAAGGTG 189
```

(15) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:15:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 250 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 125

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:15:

```
GAGCAATCCC ATGGGGATAT TCCAACCTGC AGTCCTGTCC ACGGCGGTGT 50
GGCAGGACTT CTTGCCTTTC ACAGAGTTCC AGGTAAGGCT AGTGTCTGAT 100
```



CTCCTAACCA CCGCCACAGC AAGATATCCT TCCACAGGTC TATCCACACA 150  
 GTTAGGATCA GGGTCACTGC TTTGTTGTGA TTTGTAGTTC TCTGCAAGAC 200  
 AGGCACCAAA CCACATTTAC CTGCAGTGTA AACATATCCT CCATCCAAAC 250

(16) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:16:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 254 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 126

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:16:

CCATCAGTGT TCTGCAAGAC AGTGACATCT TTCACAAATG CAACGTCTCC 50  
 AGCATTCTCA GCCAAGCAAC GGAAAGCCCC AGTGTAACCG TAGTATCTCT 100  
 CGTTGCTGTT GGGAACGCAC TTATTCTCAC CTTGCTCATC TCCAATACAC 150  
 AAAGCACAGA GATTAGATCT TGGGTCAGAA CCAGGGGCAC AGCTTTGACT 200  
 GAAATATTCA TCAAATTTGC AGGAGCCCCGT CTGGTTGAAG AGCAAGCCCA 250  
 TGGG 254

(17) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:17:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 229 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 127

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:17:

```
GCAGTCAGAT CCATTTCTAC CAAATTTAGC CTGTTGGTGG AGCAACACCT 50
GTTTCAAGCG TTCCACCTTA TCCATACGAG ACACCACAGC ATGATTCGGG 100
GCCATGGCAA GATGGCAGCT TCTAGCTTCA GTCACAGGCT TACGTTTGCC 150
ATCGAGGCAC AGCAACGCAA AGTCTGCAAG CTTCAAATCC TTAGCCCATG 200
CCTCATTGTT ATTTCCATCA GTGTTCTGC 229
```

(18) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:18:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 210 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: singola

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(A) NOME: PLT 128

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:18:

```
TTACTTCCTT AGGAATTCAC AGGCTTCTAG GAGTGGGGAG GTTGAGCACT 50
TTTTTCAGATT AGTAATGCCT GCGACATACT GTGGTCCCAA ATATTTTTC 100
TATGTTGTTT TGCCATGGAG TCTGGCAAGA CACTCAGTGT TGTCATTGAA 150
CAAAAGGTTT TTGGTTTCAG ACTGGAATAA GCAAACTTG TCCGGGCAGT 200
CAGATCCATT 210
```

15 11 19  
15 11 19  
15 11 19

## (19) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:19:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 30 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 129

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:19:

GGATCCATGG GCCGTAGGAG AAGGAGTGTT

30

## (20) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:20:

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 28 bp
- (B) TIPO: acido nucleico
- (C) NUMERO DI CATENE: singola
- (D) TIPOLOGIA: lineare

## (ii) TIPO DI MOLECOLA: oligonucleotide

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

- (A) NOME: PLT 120

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:20:

GAGCTCTTAC TTCCTTAGGA ATTCACAG

28

## (21) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:21:

5.12.12  
10.12.12

## (i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

- (A) LUNGHEZZA: 1367 bp  
 (B) TIPO: acido nucleico  
 (C) NUMERO DI CATENE: doppia  
 (D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: DNA

## (ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(D) ALTRE INFORMAZIONI: sequenza del promotore  
 del gene codificante per la globulina basica 7S

## (xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:21:

TAAAATAATC TATACATTAA AAAATTTGAT TTTAAAATTT TAGAAATTCA 50  
 TGATTTTATT TTTTTTTACC AGAAATCCGT TAATATTGTT AAAATATTAC 100  
 CAACTAATTT ATAAATTTTA TTTTAAGGCA ATTAAGCATG TTTGATAAAA 150  
 TATATATATT GTTATAAATA CTTTTCAAAA GTATAAAGTT GATGATGGCG 200  
 TGGTGGTAGA TTATTTTAGT TCTAGGTTCTG AATGCAAGTT GGTTTAGACA 250  
 TTTAGCCTTA TTCTTTTTTC TAACCAAAAT AAATGTAAAT GGAAAACCTT 300  
 TAGGAAAAAA AAGAAATCAA AATTGAAAAC ATCATCCGGT GGAGTCGAGA 350  
 AGCCACACC CACGTGACCC AACAATATTA AAATAAGAGT TTGCTCTACA 400  
 GTAAATGCGA TACTTTTTTA TTCAATACTT TTTCCACTTC TAAAATCTTG 450  
 GAGATTTGCA CCGTTAACTA ATTAAGTGTT ATATCCAACG GTCCTAAAAA 500  
 AACTTGIGTA CCGTGCCTCA CATTTCAACT TTGCGCACCC TGAAAGCCGT 550  
 TATGTTTAGG TTAGTGTTTG CAACAGTTGA AGCGCATCAC TCAGGAGGCT 600  
 ACTTGGTCTT GCTTTTTCGT CTTTTGTTCA ATTTTTCACG TGATTTTGTT 650  
 GGTGAACACG CGTACTTGAA ACTTATTATA AATTACATAA TTTTATAAGT 700  
 TTCACTTCTT ATATAATACT CATATAATAT ATAGGGTTTA GAATGCCAAT 750



LIBRERIA  
 S. MARIA

```

TTTTAAAAAA AGAATAAAAA AATAAATAGA ATAAAATCGA AAAAATGAAA 800
TGTA AAAAAT TTGAGGGGGA CAAATAAAAT ATGAAAGTCT ATTATTTAAA 850
TTTTCCATTA GAATTCTATT TTCCTTAGTT AATATGAGCT AGCCAGTTGG 900
GAGATACACG AAAATGTCAT GAAACAGTTG CATGTAGGGA AATTAATGTA 950
GTAGAGGGGAT AGCAAGACAA AAATCCAAGC CAAGCTAGCT GCTCACGCGA 1000
ACTCGATCCA CACGTCCTTT ACAGAGTTTC AAACGGATGA AATCTGCATG 1050
GCATGCAACT AAAGCATTGT TCTCAGCTGC CAAGTACCCC TCACACTCAC 1100
CAACCCTTTG TTTTCTCCC CATTGCATGT TAACTCAAGT TTATCCTTTC 1150
TTTGCTTCTG GAAATTTTAC AAGCCTCAAA CACGTCGACG TCCAATCTTG 1200
TGACCAACAC GGCCAAAAGA AAAGAGAATC TCATCCCGTT CACACTTAGC 1250
CACTTAAAGC TAGCCAAACG GTGATCTTTC TCTATATATT GTAGCTCTCT 1300
AACACAACCA ACACTACCAT TATTCAATAT TCAAACCTTG CTCTATACTA 1350
CACACACTAG AAGAATA 1367

```

(22) INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA SEQ ID NO:22:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA

(A) LUNGHEZZA: 962 bp

(B) TIPO: acido nucleico

(C) NUMERO DI CATENE: doppia

(D) TIPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: DNA

(ix) CARATTERISTICHE ULTERIORI

(D) ALTRE INFORMAZIONI: sequenza del promotore  
del gene codificante per la  $\beta$ -conglucininina

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA SEQ ID NO:22:

GTTTTCAAAT TTGAATTTTA ATGTGTGTTG TAAGTATAAA TTTAAAATAA 50  
 AAATAAAAAC AATTATTATA TCAAATGGC AAAACATTT AATACGTATT 100  
 ATTTATTAAA AAAATATGTA ATAATATATT TATATTTTAA TATCTATTCT 150  
 TATGTATTTT TTAAAAATCT ATTATATATT GATCAACTAA AATATTTTTA 200  
 TATCTACACT TATTTTGCAT TTTTATCAAT TTTCTGCGT TTTTGGCAT 250  
 ATTTAATAAT GACTATTCTT TAATAATCAA TCATTATTCT TACATGGTAC 300  
 ATATTGTTGG AACCATATGA AGTGTTTATT GCATTGACT ATGTGGATAG 350  
 TGTTTTGATC CATGCCCTTC ATTTGCCGCT ATTAATTAAT TTGGTAACAG 400  
 ATTCGTTCTA ATCAGTTACT TAATCCTTCC TCATCATAAT TAATCTGGTA 450  
 GTTCGAATGC CATAATATTG ATTAGTTTTT TGGACCATAA GAAAAAGCCA 500  
 AGGAACAAAA GAAGACAAAA CACAATGAGA GTATCCTTTG CATAGCAATG 550  
 TCTAAGTTCA TAAAATTCAA ACAAAAACGC AATCACACAC AGTGGACATC 600  
 ACTTATCCAC TAGCTGATCA GGATCGCCGC GTCAAGAAAA AAAAAGTGG 650  
 CCCCAAAAGC CATGCACAAC AACACGTAAT CACAAAGGCG TCAATCGAGC 700  
 AGCCCAAAAC ATTCACCAAC TCAACCCATC ATGAGCCAC ACATTTGTTG 750  
 TTTCTAACC AACCTCAAAC TCGTATTCTC TTCCGCCACC TCATTTTGT 800  
 TTATTTCAAC ACCCGTCAAA CTGCATCCCA CCCCCTGGCC AAATGTTTAT 850  
 GCATGTTAAC AAGACCTATG ACTATAAATA TCTGCAATCT CGGCCCAAGT 900  
 TTTTCATCATC AAGAACCAGT TCAATATCCT AGTACGCCGT ATTAAAGAAT 950  
 TTAAGATATA CT 962

Gilberto. Tonon  
 (iscr. Albo n. 83 BM)




103  
 103  
 103

## RIVENDICAZIONI

RM 98 A 000478

1. Polinucleotide codificante per la lattoferrina umana, caratterizzato dal fatto di avere una sequenza totalmente o parzialmente corrispondente alla sequenza riportata come SEQ ID NO:1, e dal fatto che detta sequenza è ottimizzata per la espressione in pianta.

2. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1, detto polinucleotide presentando fusa alla parte 5' terminale una sequenza scelta dal gruppo comprendente le sequenze riportate come SEQ ID NO: 13 e NO: 14.

3. Lattoferrina umana, caratterizzata dal fatto di essere ottenuta dalla espressione di un polinucleotide secondo la rivendicazione 1 oppure 2.

4. Vettore di DNA ricombinante caratterizzato dal fatto di comprendere almeno una sequenza codificante per un gene di interesse operativamente collegata ad elementi di regolazione che ne consentono la espressione tessuto specifica.

5. Vettore secondo la rivendicazione 4, detti elementi di regolazione essendo costituiti da una "cassetta di espressione per piante" che consente

M.M.  
ROMA

la espressione tessuto specifica di detto gene di interesse.

6. Vettore secondo la rivendicazione 5, in cui detta cassetta di espressione per piante è costituita dagli elementi di regolazione del gene codificante per la proteina Globulina basica 7 S.

7. Vettore secondo la rivendicazione 6, in cui la sequenza del promotore è la sequenza riportata come SEQ ID NO:21

8. Vettore secondo la rivendicazione 5, in cui detta cassetta di espressione per piante è costituita dagli elementi di regolazione del gene codificante per la proteina  $\beta$ -conglucininina.

9. Vettore secondo la rivendicazione 8, in cui la sequenza del promotore è la sequenza riportata come SEQ ID NO:22.

10. Vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 9, in cui la sequenza del gene di interesse è operativamente collegata ad una sequenza "leader".

11. Vettore secondo la rivendicazione 10, detta sequenza "leader" essendo fusa alla sequenza codificante per il gene di interesse.

12. Vettore secondo la rivendicazione 10 oppure 11, detta sequenza leader essendo scelta dal



S.I.E.  
NOVA

gruppo comprendente le sequenze secondo la rivendicazione 2.

13. Vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 12, in cui detto gene di interesse è il gene della lattoferrina umana.

14. Vettore di DNA ricombinante secondo la rivendicazione 13, detta sequenza essendo la sequenza secondo la rivendicazione 1.

15. Vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 14, detto vettore essendo un plasmide.

16. Vettore secondo la rivendicazione 15, detto plasmide essendo scelto dal gruppo comprendente pUC, pGEM e pBI.

17. Procedimento di trasformazione di cellule vegetali caratterizzato dal fatto che detta trasformazione è effettuata con un vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 16.

18. Cellule vegetali transgeniche caratterizzate dal fatto di essere ottenibili tramite trasformazione di cellule vegetali di tipo selvatico con un vettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 16.

19. Cellule vegetali transgeniche caratterizzate dal fatto di contenere un gene di

54.55  
NOV 1974

interesse operativamente collegato in una "cassetta di espressione" che consente la espressione tessuto specifica di detto gene.

20. Cellule vegetali transgeniche secondo la rivendicazione 19, detto gene di interesse essendo quello codificante per la lattoferrina umana.

21. Cellule vegetali transgeniche secondo la rivendicazione 20, detto gene codificante per la lattoferrina umana avendo una sequenza corrispondente a quella secondo la rivendicazione 1.

23. Cellule vegetali transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 21, in cui detta cassetta di espressione comprende la regione di regolazione del gene codificante per la Globulina basica 7S.

24. Cellule vegetali transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 21, in cui detta cassetta di espressione comprende la regione di regolazione del gene codificante per la  $\beta$ -conglucininina.

25. "Aggregati cellulari" caratterizzati dal fatto di essere ottenibili dalle cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 18 a 24.

26. "Aggregati cellulari" secondo la

rivendicazione 25, detti aggregati essendo calli in grado di rigenerare piante transgeniche.

27. Piante transgeniche caratterizzate dal fatto di essere ottenibili dalle cellule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 18 a 24, tramite tecniche convenzionali.

28. Piante transgeniche caratterizzate dal fatto di contenere un gene di interesse operativamente collegato in una "cassetta di espressione" che consente la espressione tessuto specifica di detto gene di interesse.

29. Piante transgeniche secondo la rivendicazione 28, detto gene di interesse essendo quello codificante per la lattoferrina umana.

30. Piante transgeniche secondo la rivendicazione 29, detto gene codificante per la lattoferrina umana avendo una sequenza corrispondente a alla sequenza di cui alla rivendicazione 1.

31. Piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 30, dette piante essendo scelte dal gruppo comprendente solanacee, cereali, leguminose, piante da frutto e orticole.

32. Pianta transgenica secondo la rivendicazione 31, detta pianta essendo la soia.

108  
108

33. Pianta transgenica secondo la rivendicazione 31, detta pianta essendo il tabacco.

34. Pianta transgenica secondo la rivendicazione 31, detta pianta essendo il riso.

35. Piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 34, detto gene essendo espresso specificamente nei tessuti di riserva.

36. Piante transgeniche secondo la rivendicazione 35, detti tessuti di riserva essendo quelli del frutto.

37. Uso di piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 36, come *nutriceuticals*.

38. Procedimenti di produzione di cibi funzionali contenenti proteine prodotte dalle piante, caratterizzati dal fatto di utilizzare le piante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 36.

39. Procedimenti di produzione di cibi funzionali secondo la rivendicazione 38, detti procedimenti essendo finalizzati alla produzione di latti vegetali, succhi di frutta, omogeneizzati di frutta e/o omogenizzati di verdura.

40. Procedimenti di produzione di latti vegetali, a partire da proteine in forma naturale



e/o in concentrato, caratterizzati dal fatto di utilizzare proteine derivate da piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 36.

41. Procedimento di produzione di lattoferrina umana, caratterizzato dal fatto di utilizzare piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 36.

42. Lattoferrina umana caratterizzata dal fatto di essere ottenuta da piante transgeniche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 27 a 36.

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

*Olberto Tonon*  
(lec. Albo n. 83 BM)



2.1.5.  
2004

RM 98 A 000478

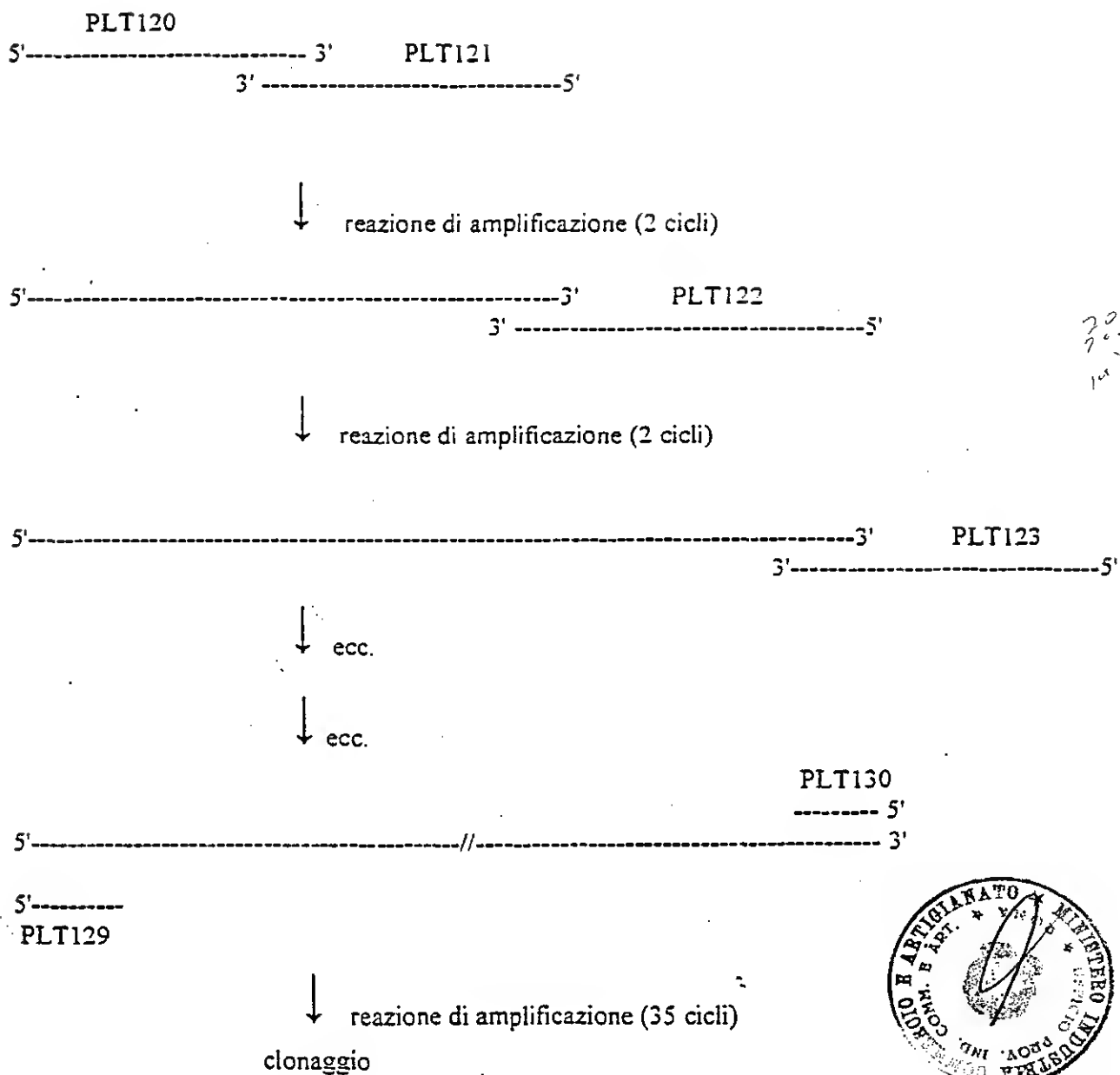


FIGURA 1 : Strategia di assemblaggio del gene sintetico per la lattoferrina umana utilizzando oligonucleotidi PLT 120-130



RM 98 A 000 478

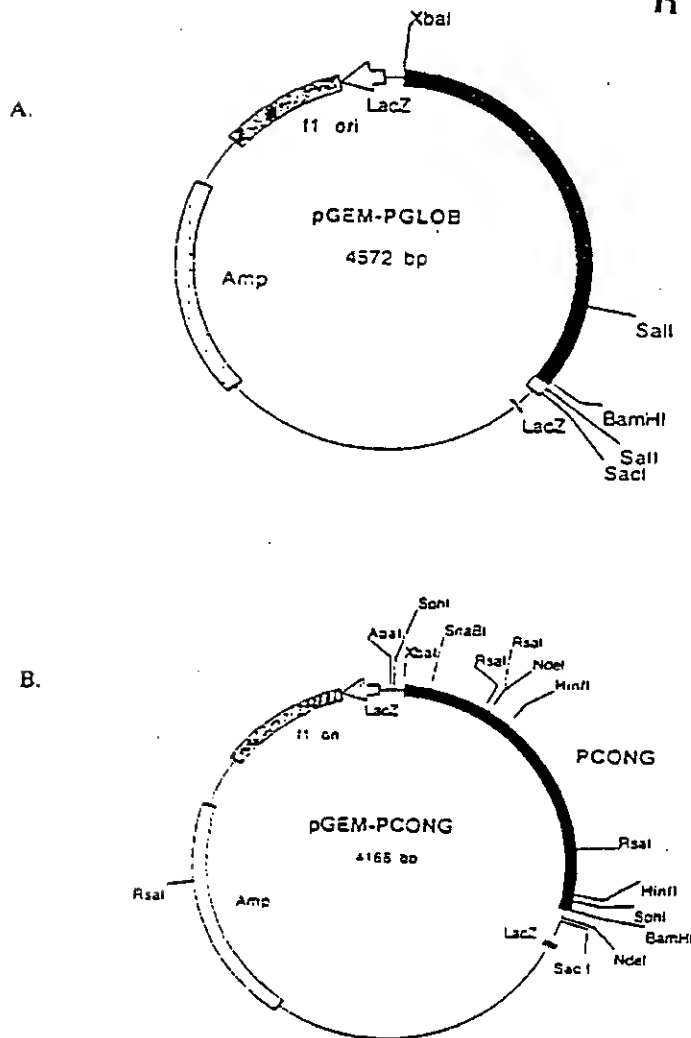


FIGURA 2



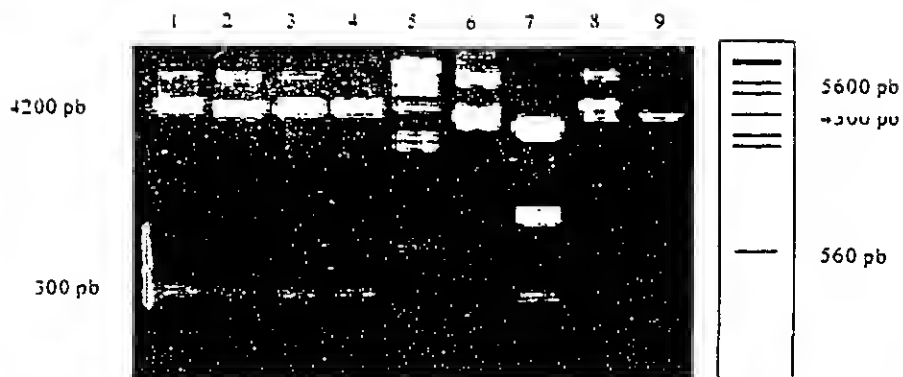


FIGURA 3

RM 98 A 000 478

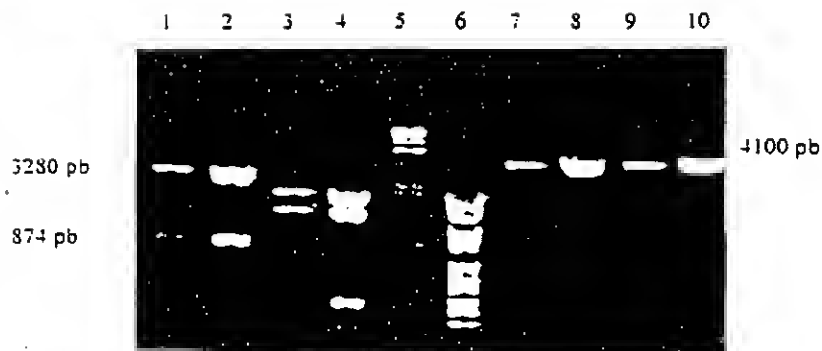


FIGURA 4

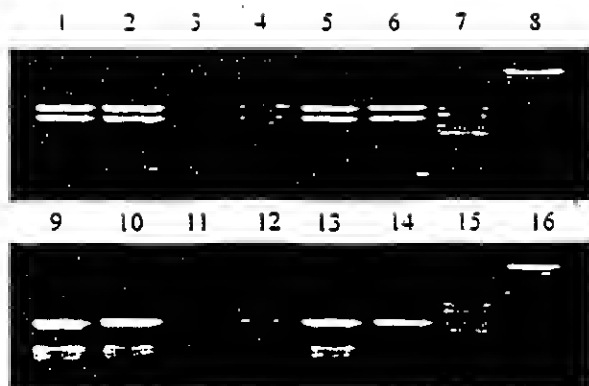


FIGURA 5



Gilberto Tonon  
(Det. Albo n. 93 Ed.)

*Handwritten signature*

RM 98 A 000 478

Werner

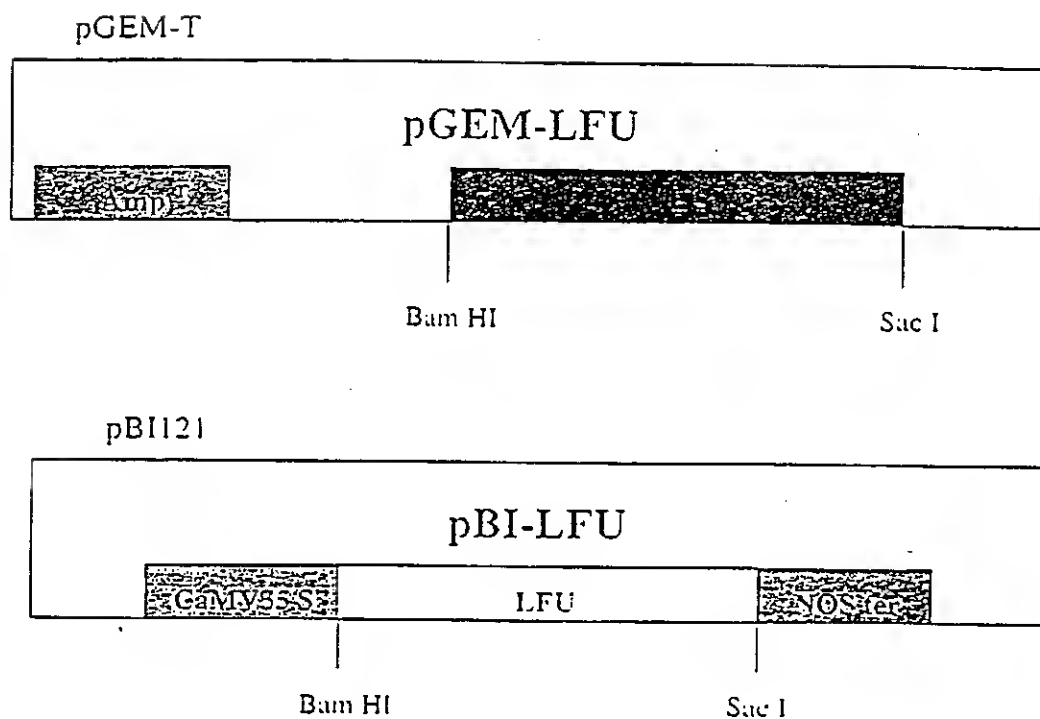


FIGURA 7

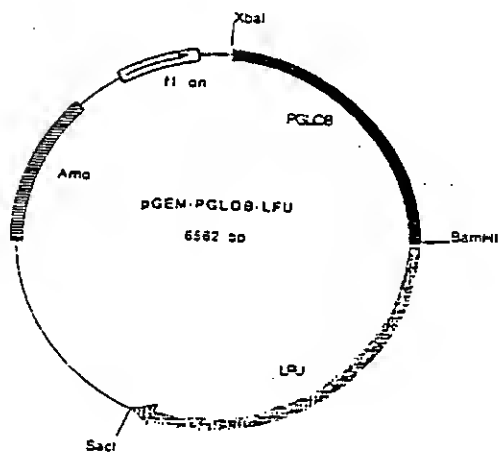
RM 98 A 000478



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

Gilberto Tonon  
(Iscr. Albo n. 23 BM)

A.



B.

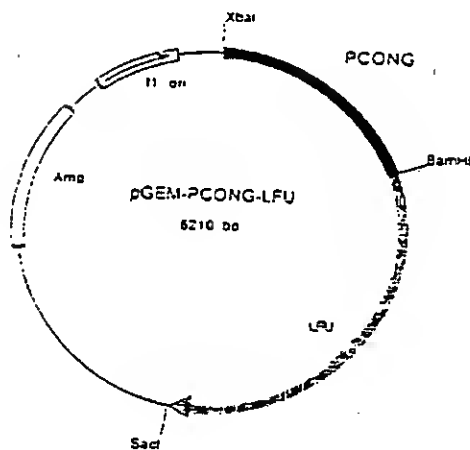


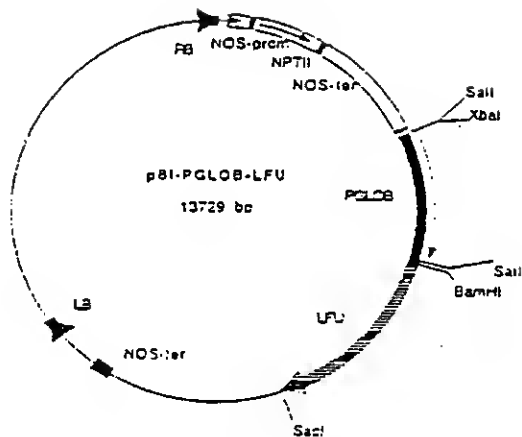
FIGURA 8

RM 98 A 000478



A handwritten signature, likely of Gilberto Tonon, in dark ink.

A.



B.

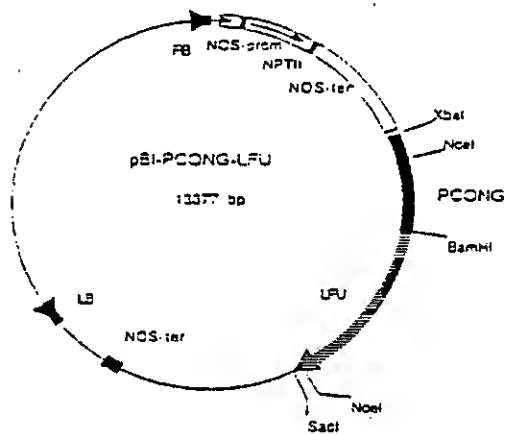


FIGURA 9

R<sup>n</sup> 98 A 000478



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

Gilberto Tonon  
(Iscr. Alb. n. 83 BM)

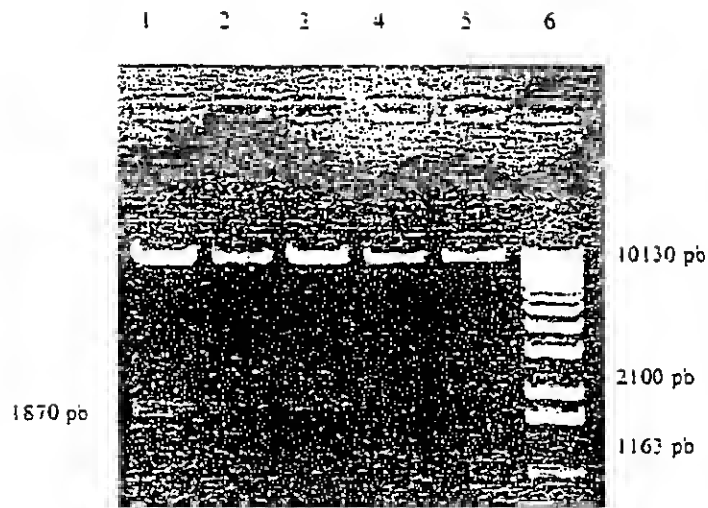


FIGURA 10

RM 98 A 000 478

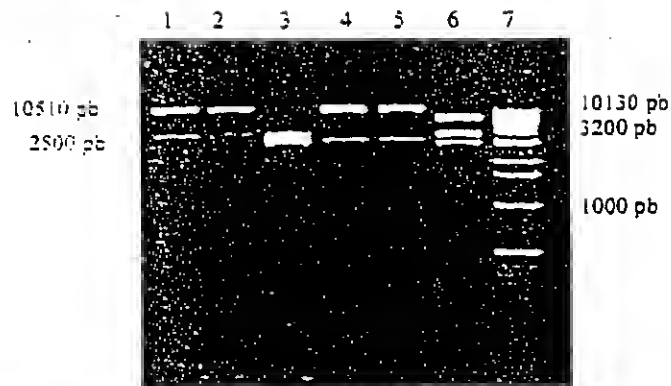


FIGURA 11



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

Gilberto Tonon  
(scr. Alb n. 83 BM)

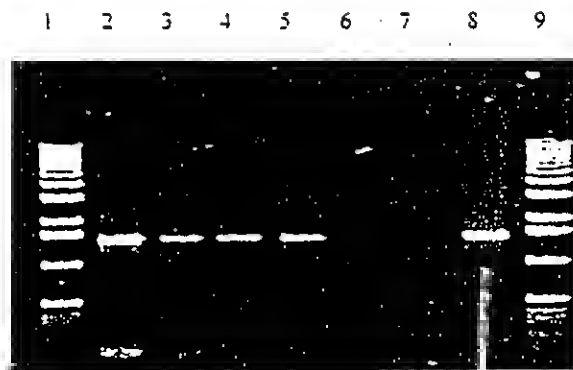


FIGURA 12

98 A 000 478



Gilberto Tonon  
 (Ass. Albo n. 80 SM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

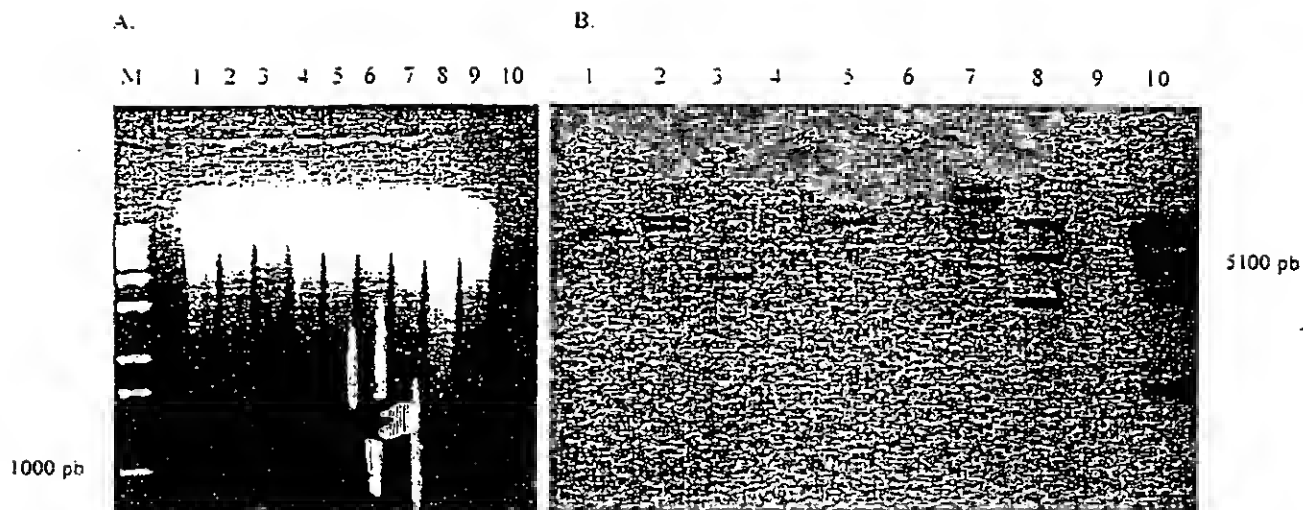


FIGURA 13

RM 98 A 000478



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

Gilberto Tonon  
(lec. Alb n. 93 BM)

Detailed description: A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gilberto Tonon".

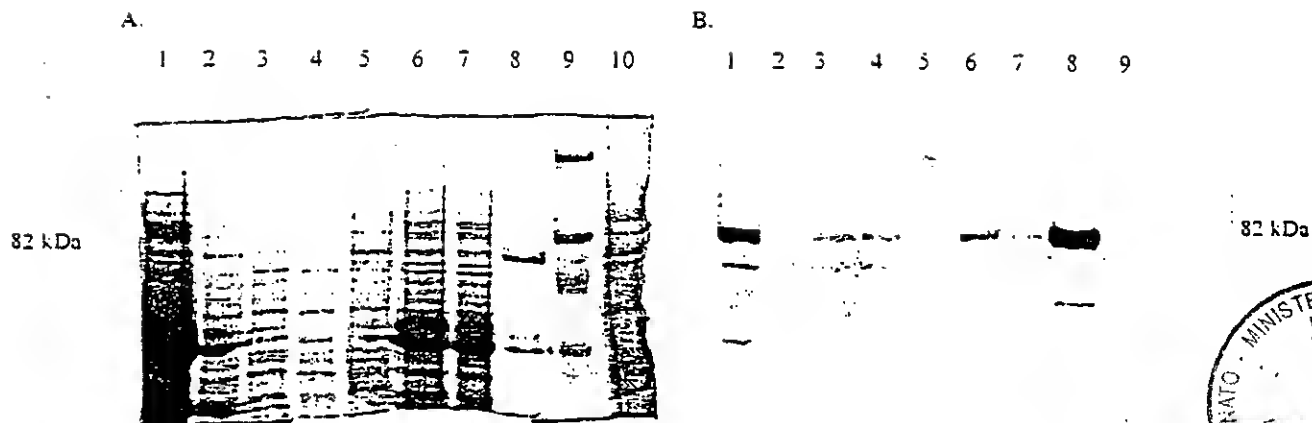
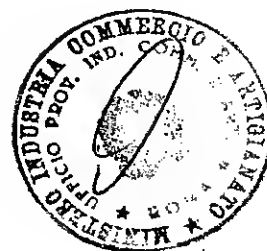


FIGURA 14



RM 98 A 000478



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

**Gilberto Tonon**  
(Iscr. Albo n. 83 BM)

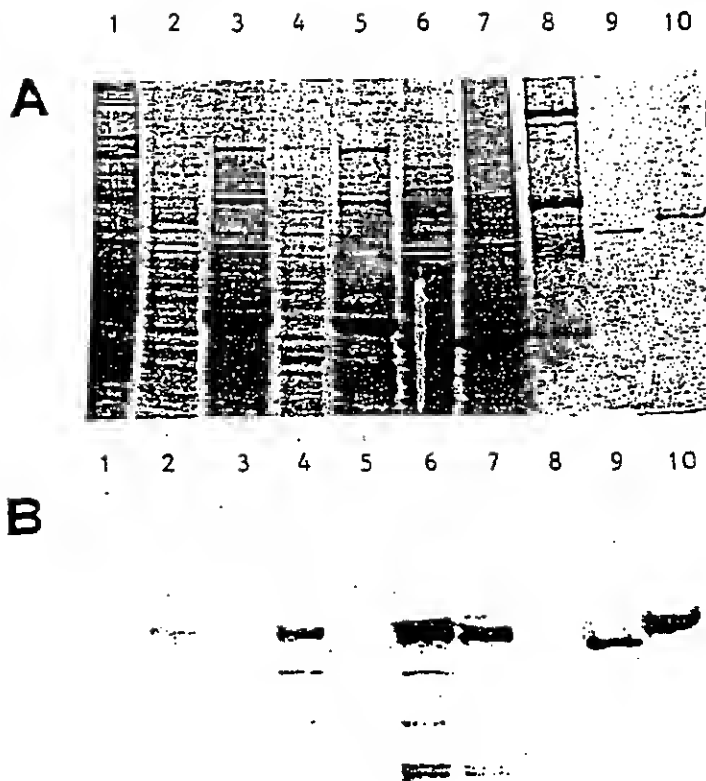


FIGURA 15

R.M. 98 A 000478



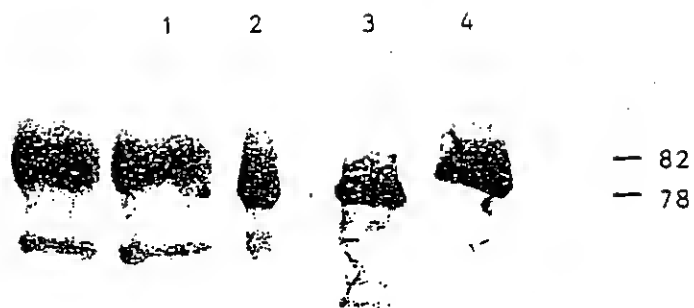


FIGURA 16

RM 98 A 000 478



p.p. PLANTECHNO S.r.l.

**Gilberto Tonon**  
(Iscri. Albo n. 83 BM)



A. RICHIEDENTE (1)

1) Denominazione PLANTECHNO S.r.l. ISR  
Residenza CASALMAGGIORE (CREMONA) ITALIA I codice 01080070194  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome de Benedetti Fabrizio ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI S.p.A.  
via Piazza di Pietra n. 0039 città ROMA cap 00186 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

O. TITOLO

classe proposta (sez/ci/scf) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

"POLINUCLEOTIDE SINTETICO CODIFICANTE PER LA LATTOFERRINA UMANA, VETTORI, CELLULE E PIANTE TRANSGENICHE CHE LO CONTENGONO".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) FOGHER Corrado 3) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_ 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ nessuna

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

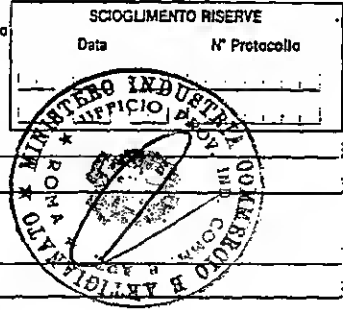
N° Protocollo

1) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

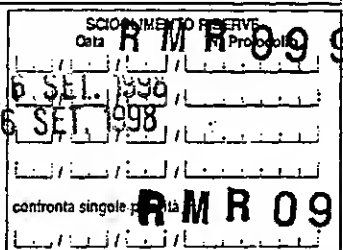
nessuna



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 1112 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
Doc. 2) 12 PROV n. tav. 13 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  
Doc. 3) 10 RIS lettera d'incarico, procedura di deposito, procedura generale  
Doc. 4) 10 RIS designazione inventore  
Doc. 5) 10 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano  
Doc. 6) 10 RIS autorizzazione o atto di cessione  
Doc. 7) 10 nominativo completo del richiedente



B) attestati di versamento, totale lire

un milione quattrocentoquindici mila

obbligatorio

COMPILATO IL 17 07 1998

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE (1)

Gilberto Tonon

CONTINUA SUO NO

(sacr. Albo n. 83 BM)

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SUO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 98 A 000478

ROMA

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno millenovecento

novantotto

il giorno

Diciassette

del mese di

Luglio

Il (1) richiedente (1) sopradenotato (1) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartito.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

L'ufficiale Rogante



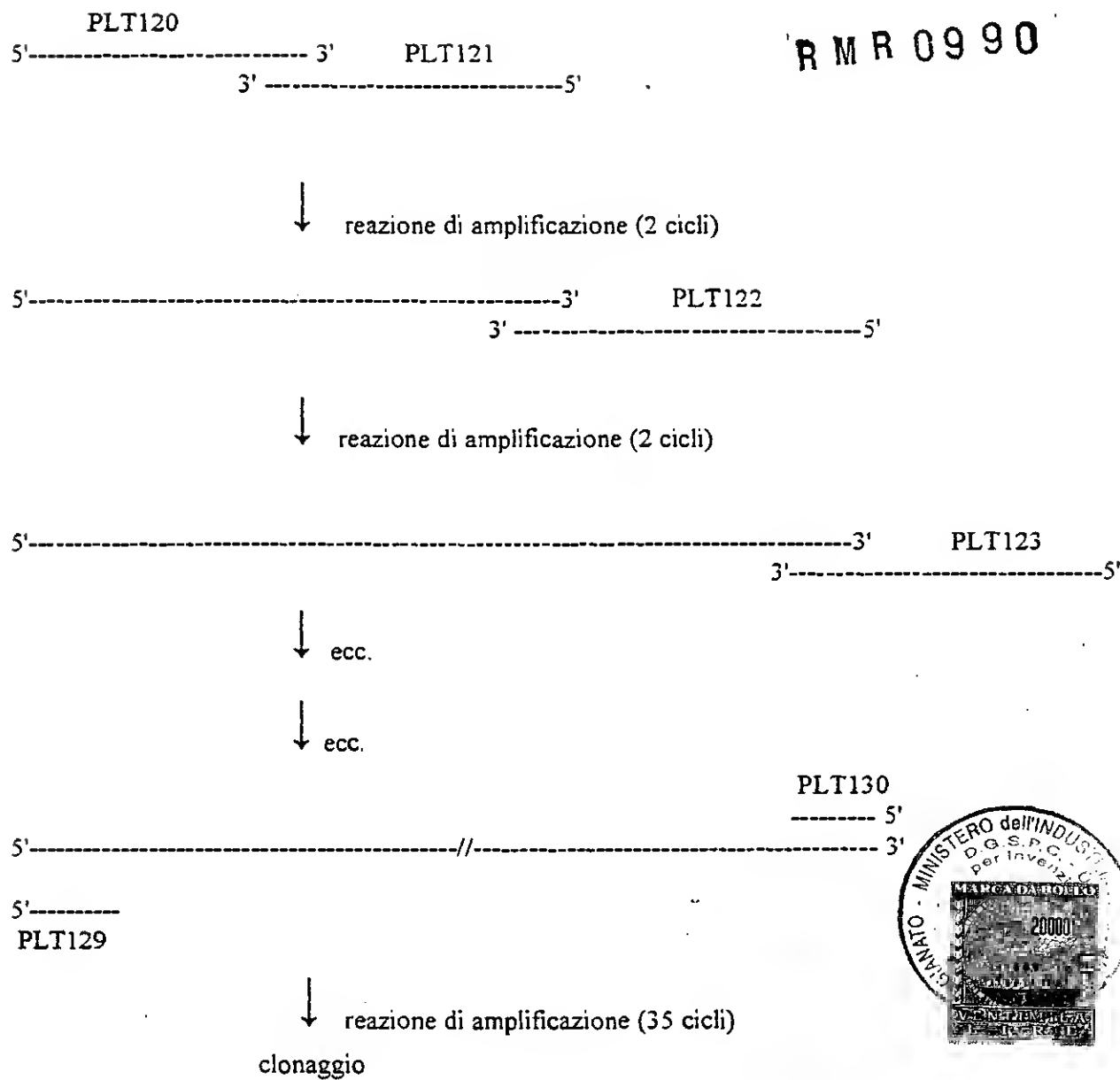
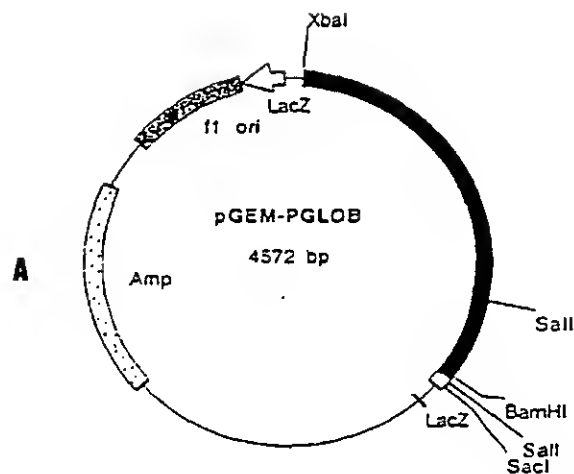


FIG.1

Gilberto Tonon  
(Isr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

*[Signature]*



RMR 0990

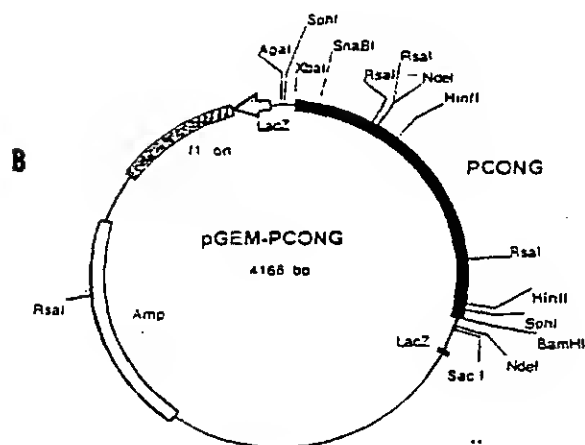


FIG.2



Gilberto Tonon  
(Iscr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

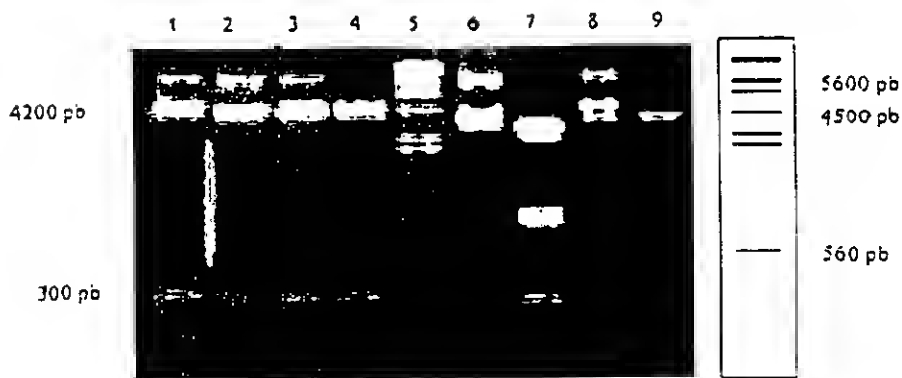


FIG.3

R M R 09 90

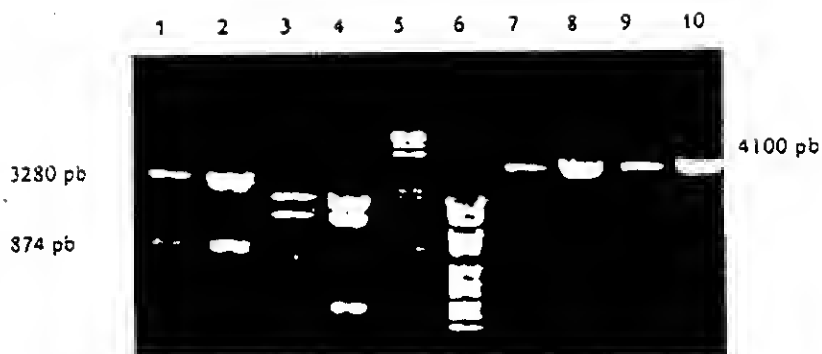


FIG.4

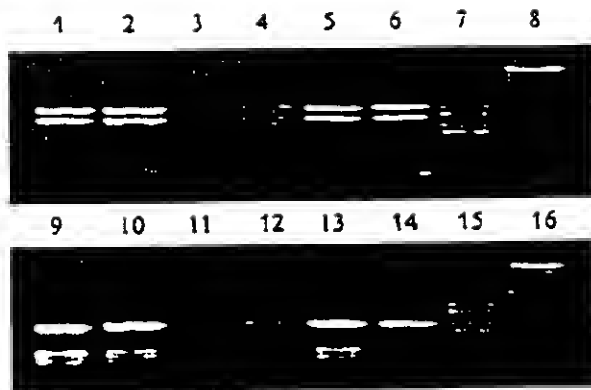
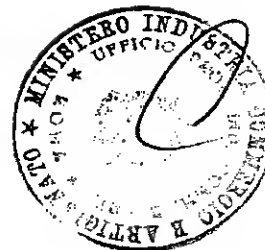


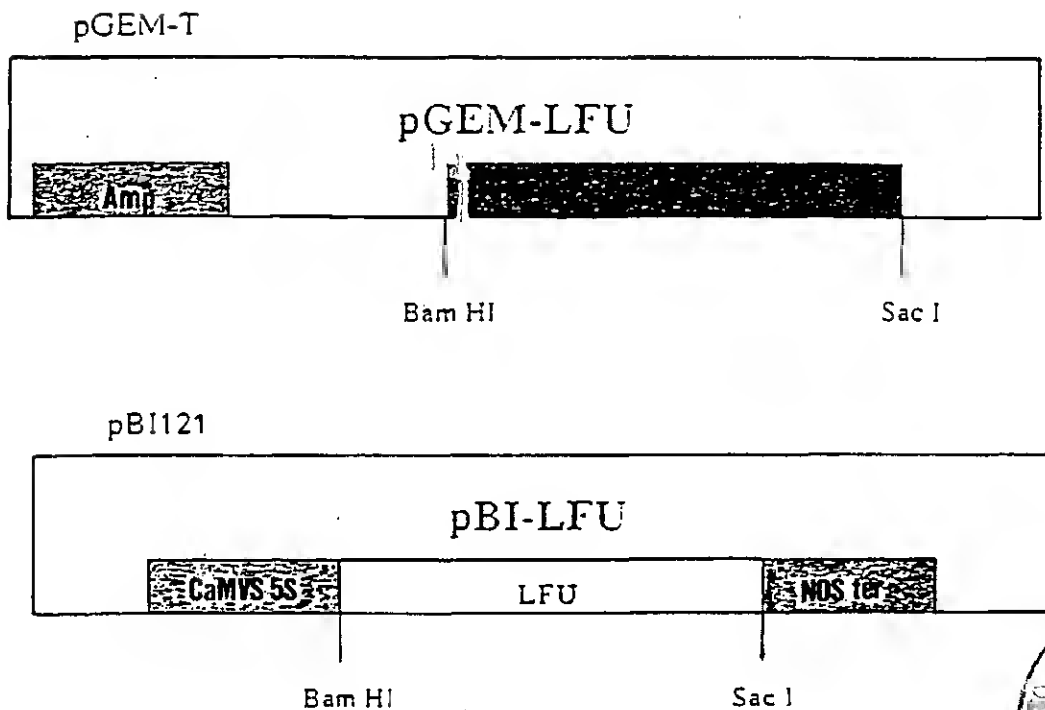
FIG.5



Gilberto Tonon  
(Iscri. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

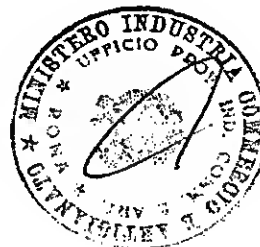
R M R 0990



**FIG.7**



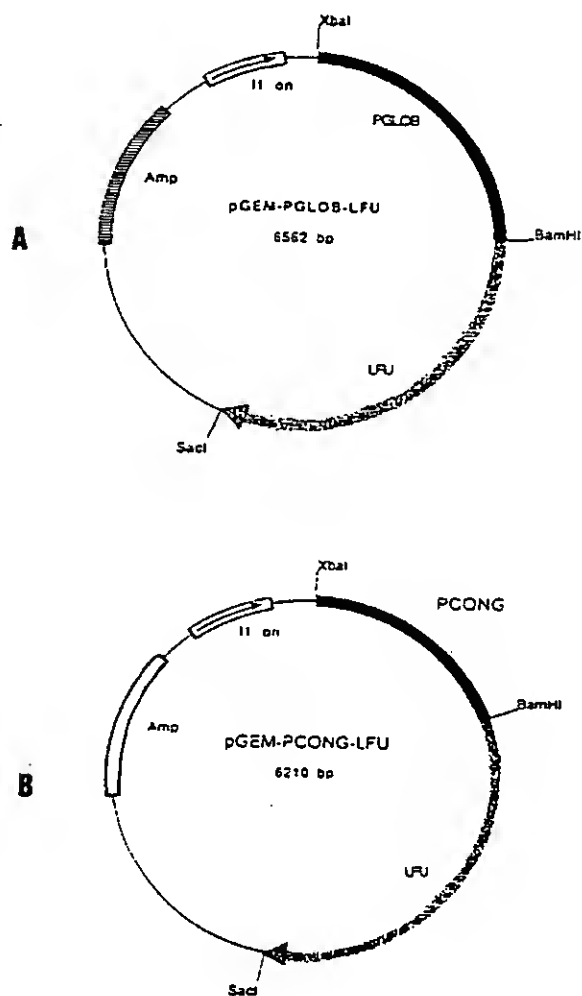
RM R 09 90



*Gilberto Tonon*  
(Isr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

*Tonon*



R M R 09 90

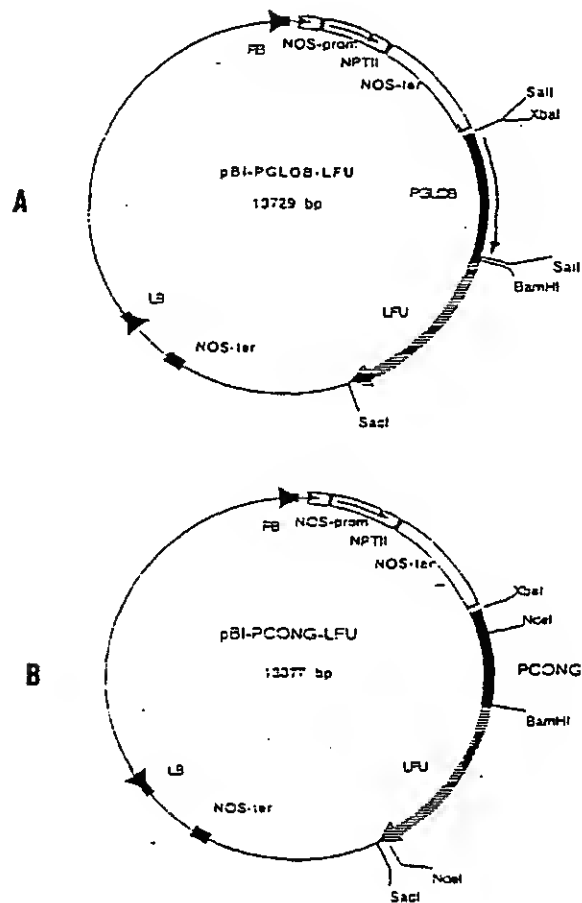


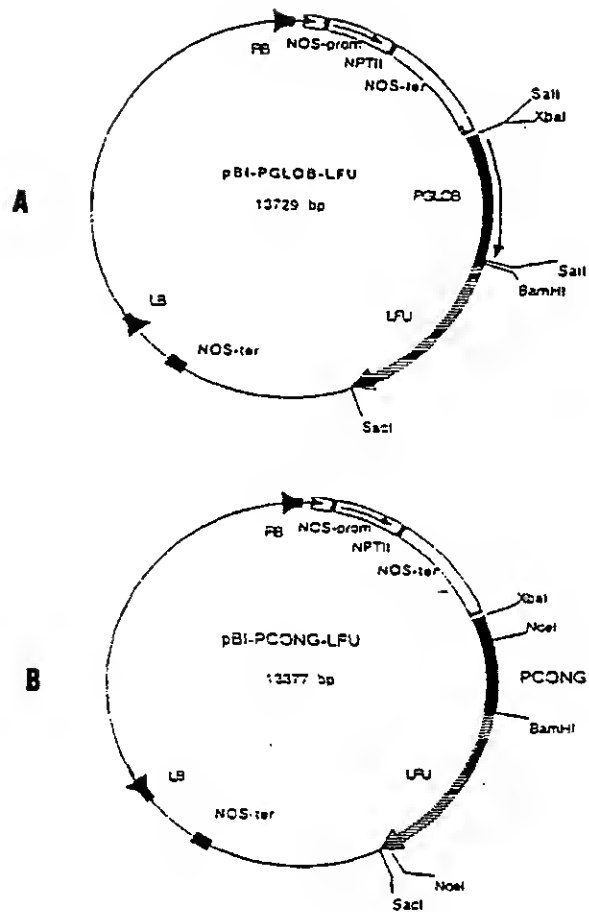
Gilberto Tonon  
(iscr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

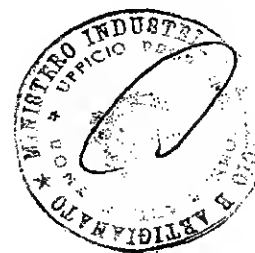
vettori su menzionati, nonché i procedimenti di produzione di cibi funzionali, latti vegetali, e lattoferrina umana, che le utilizzano.

M. DISEGNO



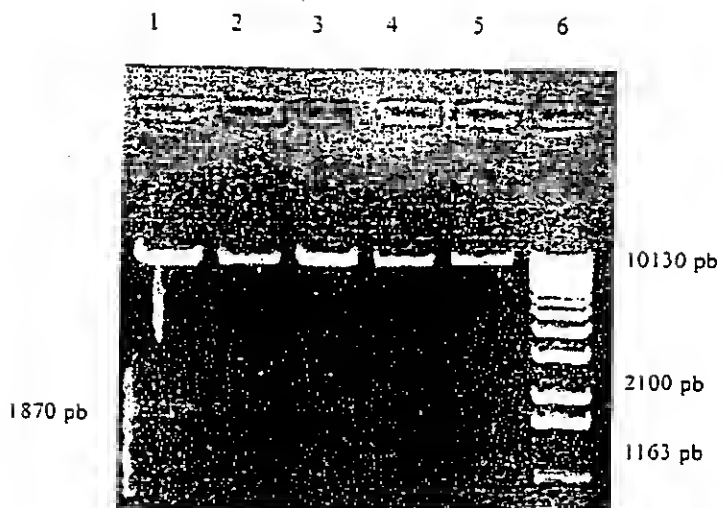


RMR0990

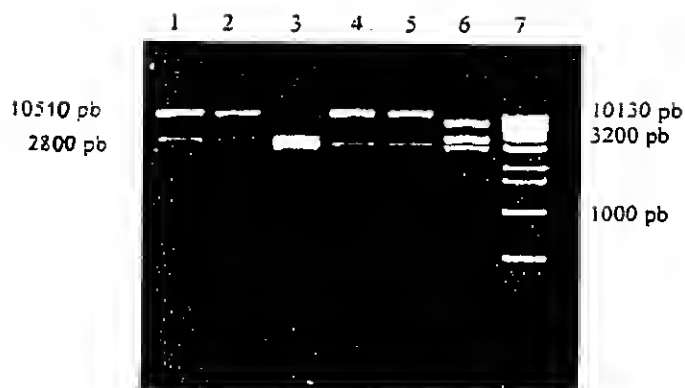


Gilberto Tonon  
(iscr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.



**FIG. 10**



**FIG. 11**

**R M R 0990**



*Gilberto Tonon*  
(iscr. Albo n. 83 BM)

*[Handwritten signature]*

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

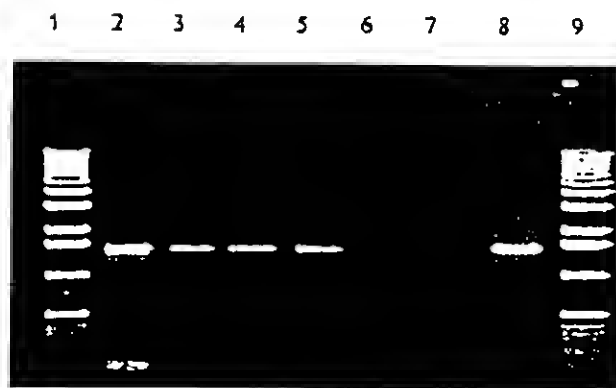
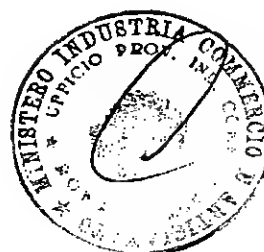


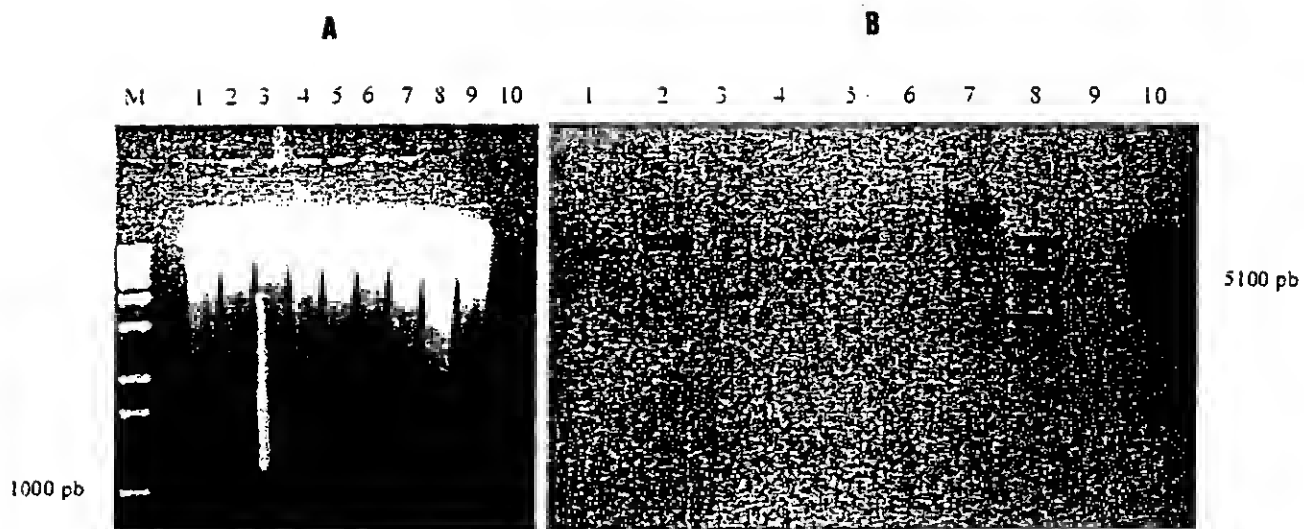
FIG.12

R M R 09 90



*Giulberto Tonon*  
(lecr. Alb n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.



**FIG.13**

**R M R 0990**



*Gilberto Tonon*  
(Iscr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

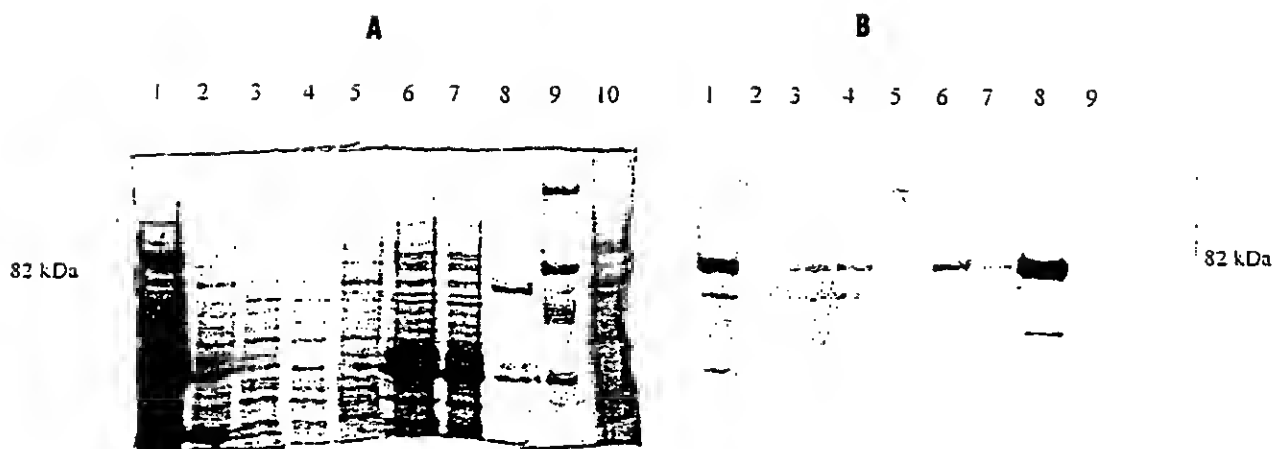


FIG.14

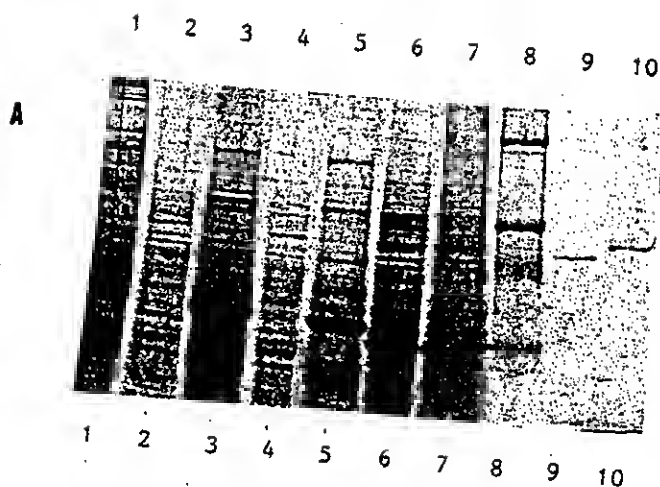
RMR 0990



Gilberto Tonon  
(iscr. Albo n. 83 8M)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

A handwritten signature, likely of Gilberto Tonon, written in dark ink.



B

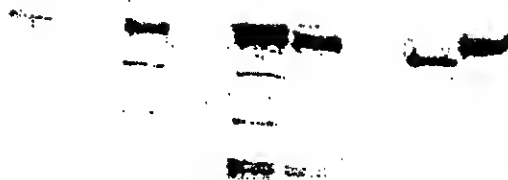
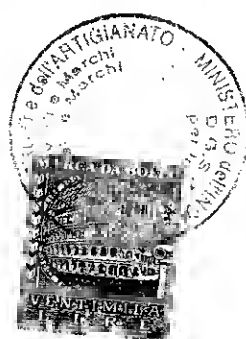


FIG. 15



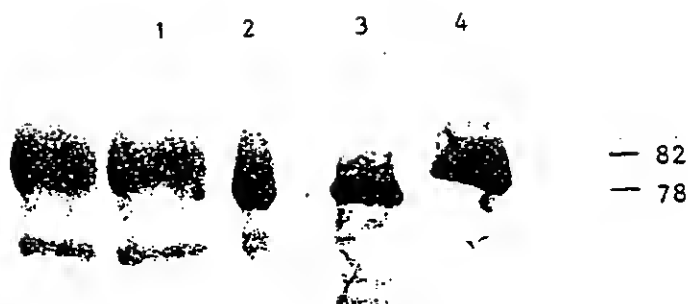
RM R 09 90



Gilberto Tonon  
(Iscri. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.

*Tonon*



**FIG. 16**

RM 98 A 000



*Gilberto Tonon*  
(iscr. Albo n. 83 BM)

p.p. PLANTECHNO S.r.l.